Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Bernhard Siebold

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0018

D I S S E R T A T I O N

Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Bernhard Siebold
aus Freiburg
1986

STRUKTUR
DER N- UND C-TERMINALEN DOMÄNEN
DES BASALMEMBRANEN KOLLAGENS

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Kühn
Prof. Dr. Guido Hartmann

Tag der Prüfung: 15.12.1986

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Zeit von April 1983 bis Juni 1986 durchgeführt.

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Dr. Klaus Kühn, der mir es ermöglichte, die vorliegende Arbeit in der Abteilung für Bindegewebsforschung anfertigen zu können. Seine wissenschaftliche Anleitung und stets wohlwollende Unterstützung waren mir wertvolle Hilfen.

Herrn Dr. Rainer Deutzmann und Herrn Dr. Robert Glanville gilt mein ganz besonderer Dank für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, die stets konstruktiven Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich auch Frau Veronika Legner, Frau Sabine Tolle und Frau Hanna Wiedemann, sowie Herrn Albert Ries und Herrn Wolfgang Straßhofer für praktische Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit. Wissenschaftliche Unterstützung fand ich bei zahlreichen Kollegen der Abteilung. Mit ihren fachlichen Anregungen und Diskussionen hatten sie ebenfalls Anteil an der Durchführung dieser Arbeit, wofür ich allen danke.

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

(1) Glanville, R.W., Qian, R., Siebold, B., Risteli, J., Kühn, K.,
Amino acid sequence of the N-terminal aggregation and cross-linking region (7s domain) of the α1(IV) chain of human basement membrane collagen.
Eur. J. Biochem. 152 (1985) 213-219

(2) Oberbäumer, I, Laurent, M., Schwarz, U., Sakurai, Y., Yamada, Y., Vogeli, G., Voss, T., Siebold, B., Glanville, R.W., Kühn, K.,
Amino acid sequence of the non-collagenous globular domain (NC1) of the α1(IV) chain of basement membrane collagen as derived from complementary DNA.
Eur. J. Biochem. 147 (1985) 217-224

In Vorbereitung:

(3) Siebold, B., Deutzmann, R., Kühn, K.,
Structure of the non-collagenous globular domain (NC1) of human basement membrane collagen, the arrangement of the disulfide bridges and its involvement in intermolecular cross-links.

(4) Siebold, B., Qian, R., Glanville, R.W., Hofmann, H., Deutzmann, R., Kühn, K.,
Aggregation and crosslink formation of type IV collagen molecules via the N terminal 7S domain. An evaluation of the primary structure of the α1(IV) and α2(IV) chain.

Liste der Abkürzungen

α1(IV)7s	α1-Kettenfragment der 7s-Domane von Typ IV Kollagen
α2(IV)7s	α2-Kettenfragment der 7s-Domane von Typ IV Kollagen
α1(IV)NC1	α1-Kettenfragment der NC1-Domane von Typ IV Kollagen
α2(IV)NC1	α2-Kettenfragment der NC1-Domane von Typ IV Kollagen
7sS	kurze Form des 7s-Kollagens
7sL	lange Form des 7s-Kollagens
AEC	S-Aminoethylcystein
AH-Peptide	Peptid, entstanden nach Säurehydrolyse
BrCN	Bromcyan
CB-Peptide	Bromcyan-Peptide
CPP	Carboxypeptidase P
Da, kDa	Dalton, kilo Dalton
EM	Elektronenmikroskopie
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HOAc	Essigsäure
Hyl	Hydroxylysin
Hyp	Hydroxyprolin
JAcONa	Natriumsalz der Jodessigsäure
MG	Molekulargewicht
NH_4OAc	Ammoniumacetat
$(NH_4)_2SO_4$	Ammoniumsulfat
o-JBS-Peptide	ortho-Jodosobenzoesäure-Peptide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PTH	Phenylthiohydantoin
Quadrol	N,N,N',N'-tetrakis-(2-hydroxypropyl)-ethyldiamin
SDS	Natriumdodecylsulfat

SP-Peptid	Staphyloccocus aureus Protease-Peptide
T-Peptide	Trypsin-Peptide
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsaure
Th-Peptide	Thermolysin-Peptide
TLCK	Nα-Tosyl-L-lysinchlormethylketon
TPCK	Tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan

1. **Einleitung** 1

1.1. Kollagene 1

1.2. Struktur, Funktion und Bestandteile der Basalmembran 8

2. **Aufgabenstellung** 18

3. **Ergebnisse** 20

3.1. 7s - Quervernetzungsdomäne 20

3.1.1. Herstellung des 7s-Kollagens 23

3.1.2. Isolierung der α1(IV)- und α2(IV)-Ketten des 7s-Kollagens 26

3.1.3. Bestimmung der N-terminalen Sequenz der α1-Kette des 7s-Kollagens 28

3.1.4. Sequenzanalyse von α2(IV)7s 36

3.1.5. Kohlenhydratanalysen 42

3.1.6. Untersuchungen von Interaktionen des 7s-Kollagens mit Hilfe der Primärstrukturdaten 45

3.1.7. Reduktion von 7s lange Form in nativem Zustand 50

3.2. NC1, globuläre Quervernetzungsdomäne des Typ IV Kollagens 54

3.2.1. Isolierung der NC1-Domäne aus menschlicher Plazenta 54

3.2.2. Charakterisierung der hexameren NC1-Domäne und Auftrennung in ihre Untereinheiten 56

3.2.2.1. Isolierung und Charakterisierung der monomeren und dimeren NC1-α-Kettenfragmente 57

3.2.2.2. Isolierung von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1 und deren Charakterisierung 60

3.2.3. Isolierung und Charakterisierung der BrCN-Peptide von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1 63

3.2.4. Isolierung und Charakterisierung der o-JBS-Peptide von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1 72

3.2.5. Isolierung und Charakterisierung der tryptischen Peptide von α2(IV)NC1 78

3.2.6. Anordnung der Peptide von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1 82

3.2.7. Bestimmung des C-Terminus von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1 86

3.2.8. Homologieuntersuchungen an NC1-α-Ketten 88

3.2.9. Untersuchung von Quervernetzungen der NC1-Domane 98

3.2.9.1. Intraketten Disulfidbrücken der NC1-Domane 98

3.2.9.2. Lokalisierung der intraketten Disulfidbrücken 103

3.2.9.3. Quervernetzungen der dimeren α-Ketten der NC1-Domäne 108

3.2.9.4. Interketten Disulfidbrücken der α1-Dimere 112

3.2.10. Betrachtungen zur Sekundärstruktur der NC1-α-Ketten 115

4. **Diskussion** 121

5. **Zusammenfassung** 141

6. **Material und Methoden** 144

6.1 Herstellung der Ausgangsmaterialien 144

6.2. Reduktion von Disulfidbrücken und Blockierung von freien Thiolgruppen 148

6.3. Chromatographische Methoden 149

6.4. Analytische Methoden 153

6.5. Elektronenmikroskopie 159

6.6. Komputeranalysen 160

6.7. Chemische und enzymatische Spaltungen 161

7. **Literatur** 167

1. Einleitung

1.1 Kollagene

Kollagene stellen im Gesamtorganismus die mengenmäßig vorherschenden Proteine dar. Neben anderen Makromolekulen sind sie Hauptbestandteile des Bindegewebes, wo sie z.B. als Gerüstsubstanz und Stützsubstanz dienen. Um vielen unterschiedlichen Funktionen zu genügen, hat die Natur im Laufe der Evolution verschiedene Kollagentypen entwickelt,

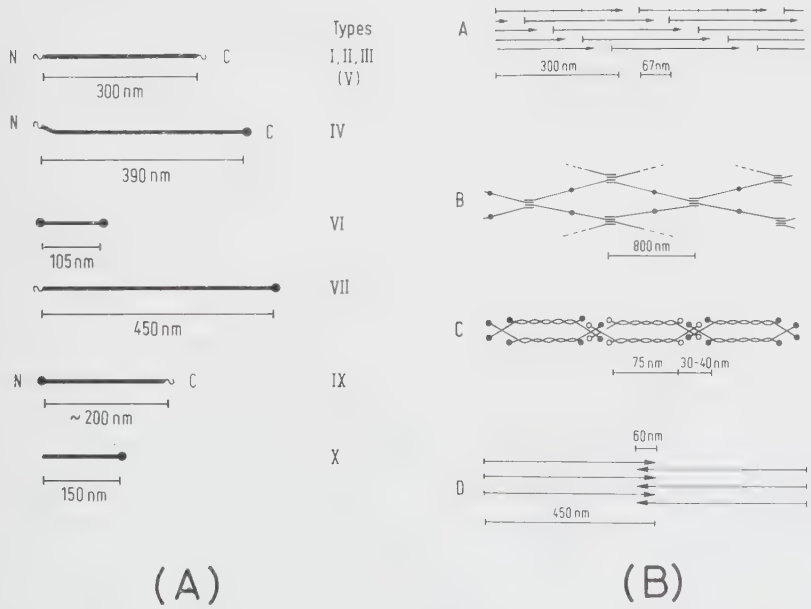


Abb.1 Schematische Darstellung der molekularen Struktur (A) und der makromolekularen Anordnung (B) verschiedener Kollagentypen.
Dicke Linien geben die tripelhelikale Domäne an; dünne Linien stellen nicht tripelhelikale Bereiche dar und ausgefüllte Kreise entsprechen globulären Domänen.

Typ	Ketten	Aggregatform	Vorkommen
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	67nm quergestreifte Fibrillen	Haut, Knochen, etc.
II	$\alpha 1(II)$	kleine 67nm quergestreifte Fibrillen	Knorpel, Glaskörper des Auges
III	$\alpha 1(III)$	kleine 67nm quergestreifte Fibrillen	Haut, Blutgefäße, innere Organe, etc.
IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV)$	nicht fibrilläres Netzwerk	alle Basalmembranen
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	kleine Fibrillen	interstitielles Gewebe
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	100 nm quergestreifte Fibrillen	interstitielles Gewebe
VII	?	Dimer	Ankerfibrillen
VIII	$\alpha 1(VIII)$	?	einige Endothelzellen
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	?	Knorpel
X	$\alpha 1(X)$	?	mineralisierender Knorpel
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$	kleine Fibrillen	Knorpel

Tab.1 Aggregatform und Vorkommen der Kollagen Typen I-XI.

welche in ihrer molekularen Struktur und makromolekularen Organisation an gewebsspezifische, biomechanische Anforderungen adaptiert wurden. Gegenwartig sind elf verschiedene Kollagentypen bekannt, die mehr oder weniger gut charakterisiert sind (Tab.1, Abb.1a,1b). Am weitesten verteilt und am besten bekannt sind die fibrillenbildenden Kollagene Typ I, II, III und V mit ihren 330nm langen, stabchenformigen Molekulen, mit deren Struktur alle anderen Typen verglichen werden. Die von ihnen gebildeten Fibrillen variieren in ihrer makromolekularen Organisation von Kollagen zu Kollagen und von Gewebe zu Gewebe. So wird z.B. Sehne aus dicken, parallelen Typ I Fibrillenbündeln aufgebaut, Knorpel dagegen tritt in einem dreidimensionalen Netzwerk dünner Typ II Fibrillen auf, in welches

wasserbindende Proteoglykane eingebettet sind (1). In Gefaßwanden und in der Haut ist Typ I mit Typ III Kollagen assoziiert, das vorwiegend dunne Fibrillen bildet, die zwischen den dickeren, zu Bündelbildung neigenden Fibrillen des Typ I eingelagert sind (2).

Typ V Kollagen bildet kleinere Fibrillen, von denen man annimmt, daß sie mit den größeren Fibrillen von Typ I und III assoziiert sind und sie entweder in Position halten oder ihre Organisation bestimmen (3,4).

Typ IV Kollagen (Abb.1a,b), welches Hauptbestandteil der Basalmembranen ist, unterscheidet sich wesentlich in seiner makromolekularen Struktur von den fibrillenbildenden Kollagenen. Seine 390nm langen Molekule bauen ein nicht fibrillares Netzwerk auf, welches durch Assoziation gleicher Enden gebildet wird (s.Abb.5, S.13).

Interessant sind auch die Typ VI Molekule, welche aus einer 105nm langen Tripelhelix bestehen, die an beiden Enden große globuläre Domänen tragen. Sie lagern sich auf eine grundlegend andere Weise zusammen, als dies bei den Molekulen der fibrillenbildenden Kollagenen beobachtet wurde. Die Aggregation, die über Dimere und Tetramere schließlich zu Mikrofibrillen führt, ist in Abbildung 1b wiedergegeben (4-6).

Eine Verbindung zwischen Basalmembranen und Interstitium stellt das Typ VII Kollagen in Form der sogenannten Ankerfibrillen her. Ihre 450nm langen Kollagen Molekule sind darin zu antiparallelen, dimeren Strukturen assoziiert und ebenso wie die Mikrofibrillen des Typ VI Kollagens durch

Disulfidbrücken stabilisiert (7,8).
Die Kollagentypen IX, X und XI, deren makromolekulare Struktur noch nicht geklärt ist, werden nur in Knorpel gefunden. Typ X, das besonders in hypertrophem Knorpel auftritt, wird eine besondere Rolle bei der Kalzifizierung zugeschrieben. Typ XI ähnelt den fibrillenbildenden Kollagenen und es gibt einige Hinweise, daß es das Knorpeläquivalent zu Typ V Kollagen ist (4,9-11).

Das, was es rechtfertigt, all diese verschiedenen Kollagentypen in einer Proteinfamilie zusammenzufassen, ist neben ihrem Vorkommen in der extrazellulären Matrix ihre gemeinsame Grundstruktur: die Tripelhelix. Sie besteht aus drei α-Ketten, wobei jede eine repetitive Gly-Xaa-Yaa-Sequenz besitzt. Diese Ketten bilden linksgängige Polyprolinhelizes, welche zusammen um eine gemeinsame Achse eine rechtsgängige Tripelhelix ausbilden. Die Ketten sind so gestaffelt, daß alle Glycine der drei Ketten abwechselnd nach innen zu liegen kommen und die Seitenketten der Aminosäuren in Position Xaa und Yaa von der Helix wegweisen, wodurch sie intermolekulare Wechselwirkungen eingehen können (12). Prolin in Position Xaa und Hydroxyprolin in Position Yaa wirken durch ihre starre Molekulform stabilisierend auf die Tripelhelix (13),während eine Substitution von Glycin zu einer Störung der tripelhelikalen Struktur führt.
Die Variation der makromolekularen Kollagenstruktur geschieht vorwiegend durch Kombination verschieden langer tripelhelikaler Bereiche mit unterschiedlich großen globulären Strukturelementen.

Da die fibrillenbildenden Kollagene sozusagen den Grundtyp aller Kollagene darstellen, sollen sie etwas eingehender beschrieben werden.

Ihr homolog aufgebautes, 300nm langes, 1.4nm dickes, stabchenfomiges Molekul ist aus drei α-Ketten zusammengesetzt, welche einen zentralen, kontinuierlich tripelhelikalen Bereich von 1014 Aminosauren und kurze nicht tripelhelikale Bereiche an beiden Enden der Ketten besitzen. Diese sogenannten Telopeptide sind wichtig fur die Quervernetzungen in den Fibbrillen (14). Die Selbstaggregation der Kollagenmolekule zu Fibrillen wird durch die periodische Verteilung von intermolekular interagierenden geladenen und hydrophoben Aminosauren kontrolliert. Diese Aminosauren sind entlang der Tripelhelix in vier homologen Abschnitten D_1, D_2, D_3 und D_4 angeordnet, wobei jeder Abschnitt 234 Aminosaure-Reste umfaßt. Diese Abschnitte zwingen aggregierende Molekule in eine parallele, um D versetzte Anordnung, welche zu einer maximalen Interaktion der polaren und hydrophoben Aminosaure-Reste benachbarter Moleküle führt (Abb.2) (14,15). Diese Staffelung der Moleküle ist die Ursache fur das charakteristische Querstreifungsmuster der fibrillenbildenden Kollagene (16).

Die α-Ketten der Kollagene werden in der Zelle in einer Vorlauferform, den Prokollagen-α-Ketten, synthetisiert, welche an beiden Enden anschließend an die kurzen, nicht tripelhelikalen Telopeptide je ein sogenanntes Propeptid tragen (17). Das insgesamt etwa 140 Aminosauren lange N-terminale Propeptid ist aufgebaut aus einem globularen und

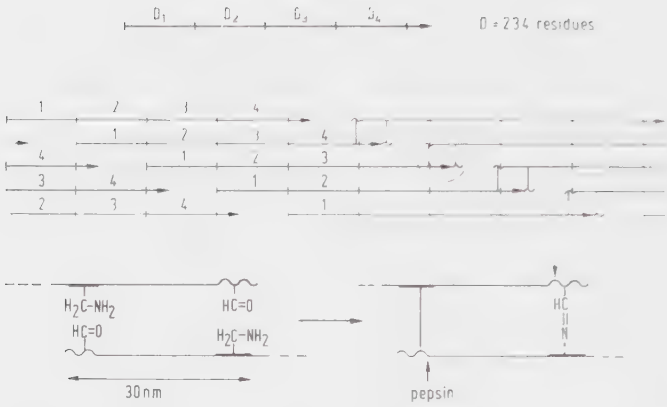


Abb.2 Schematische Darstellung der axialen Anordnung und der Quervernetzungstellen des Typ I Kollagens in einer Fibrille. Die Molekule sind gegeneinander um den Abstand D versetzt (D=234 Aminosauren oder 67nm). Die intermolekularen Quervernetzungen sind in den 30nm langen End-Regionen der Moleküle lokalisiert.

einem kleineren tripelhelikalen Bereich, wogegen das C-teminale Propeptid nur aus einer insgesamt etwa 250 Aminosauren großen, globularen Polypeptidkette besteht (18,19,24). Beiden Propeptiden werden mehrere wichtige Kontrollfunktionen zugesprochen. Die Carboxypropeptide steuern die Assoziation der drei Prokollagen-α-Polypeptidketten in korrekter Ausrichtung, so daß die Ausbildung der Tripelhelix gewahrleistet ist. Außerdem wird durch die Prokollagenpeptide eine Fibrillenbildung der Kollagene in der Zelle verhindert. Durch Reihenfolge und Zeitpunkt der Abspaltung beider Propeptide durch Amino- und Carboxypropeptidasen werden die Fibrillendurchmesser gesteuert (20). Eine Hemmung der Kollagensynthese in Fibroblasten durch das N-Propeptid deutet auf eine mogliche Beteiligung dieses Peptides an einer feed back Kontrolle der Biosynthese des

Kollagens hin.

Während und nach der Translation erfahren die naszierenden Polypeptidketten eine Serie von Modifikationen. So werden Proline und Lysine in Yaa-Positionen durch eine von Peptidylhydroxylasen katalysierten Reaktion zu 4-Hydroxyprolin bzw. Hydroxylysin hydroxyliert (Review s.21,22) und Hydroxylysine werden mit Hilfe von zwei Transferasen zu Galaktosyl-Hydroxylysin bzw. Glukosylgalaktosyl-Hydroxylysin glykosyliert (Review s.23). Eine Glykosylierung von Asparaginresten, für die eine Asn-Xaa-Ser/Thr-Sequenz notwendig ist, konnte in einigen Prokollagenpeptiden identifiziert werden, jedoch noch nie in einer tripelhelikalen Domäne eines Kollagens. Die gleichen Modifikationen wurden auch bei den anderen Kollagentypen beobachtet.

Die mechanische Stabilität einer Fibrille, welche sich nach Ausschleusen aus der Zelle und Abspalten der Propeptide durch Aggregation gebildet hat, wird durch intermolekulare Quervernetzungen erreicht. Die Bildung dieser Quervernetzungen wird initiiert durch oxidative Desaminierung von Lysinen oder Hydroxylysinen in den terminalen, nicht tripelhelikalen Telopeptiden. Die Reaktion wird katalysiert durch das Enzym Peptidyl-Lysyloxidase und führt zu Allysinen bzw. Hydroxyallysinen (25,26). Die Aldehydgruppe eines solchen Restes ist in der Lage, mit einem Hydroxylysin des tripelhelikalen Quervernetzungsbereiches zu einem δ-Hydroxyimin zu reagieren, welches über eine Amadori-Umlagerung in das stabile Hydroxylysin-5-oxo-Norleucin übergehen

kann (27,28). In Abbildung 2 ist gezeigt, wie solche Quervernetzungen benachbarte Kollagenmolekule kovalent in ihrer 4D versetzten Anordnung fixieren. Durch Reaktion mehrer Amino- oder Aldehydfunktionen miteinander können tri- oder tetrafunktionelle Quervernetzungen entstehen (29-31).

Diese Fahigkeit zur Ausbildung von intermolekularen, nicht reduzierbaren Quervernetzungen ist bisher nur an den interstitiellen Kollagenen Typ I, II und III naher untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt werden, daß auch in Typ IV Kollagen von Lysin abgeleitete Quervernetzungen eine Rolle spielen.

1.2. Struktur, Funktion und Bestandteile der Basalmembran

Basalmembranen, eine spezialisierte Form der extrazellularen Matrix, werden heute auf der Basis von elektronenmikroskopischen Untersuchungen als dünne, amorphe Schicht definiert. Sie besitzen komplexe, morphologisch unterscheidbare Strukturen, welche in verschiedenen Geweben Epithel- und Endothelzellen von darunterliegendem Gewebsstroma physikalisch trennen und Muskel-, Fett- und Nervenzellen umgeben. Sie sind an der Differenzierung , Wanderung, dem Wachstum und der Regeneration der an sie angrenzenden Zellpopulationen beteiligt. Weiterhin besitzen sie die physiologisch sehr wichtigen Fahigkeiten der Filtration von Flüssigkeit und des Gasaustausches (32). Wie man in Abbildung 3 erkennen kann, setzt sich die Basalmembran aus

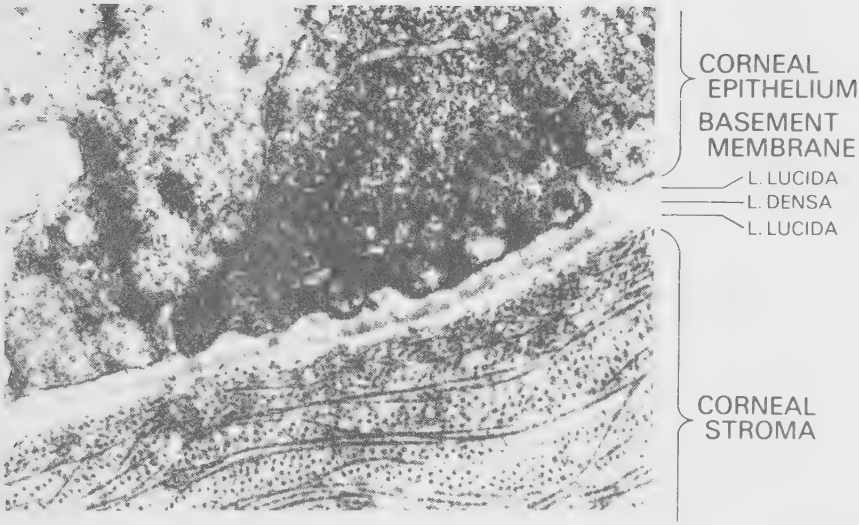


Abb.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Basalmembran aus Hühner Cornea Epithel mit (von oben nach unten) Epithelzellschicht, lamina lucida, lamina densa, lamina lucida (heute als lamina reticulara bezeichnet) und Stroma.
(aus Immunochemistry of the Extracellular Matrix (ed. Furthmayr, H.) Vol.II (1982) 121)

meistens drei elektronenoptisch unterscheidbaren Schichten zusammen:

eine elektronendichte, die lamina densa (gewöhnlich als basal lamina bezeichnet); zwei elektronendurchlässige, die lamina lucida, welche zwischen lamina densa und Epithelzellen liegt und die lamina reticulara, welche die basal lamina mit der extrazellulären Matrix verbindet (früher auch als lamina lucida bezeichnet) (Review s.32-36). Sind Basalmembranen an beiden Seiten von Zellschichten begrenzt (z.B. in Nierenglomeruli), so ist zwischen der lamina densa und den Zellschichten je eine lamina lucida vorhanden, die

lamina lucida externa und interna (37).

Struktur und Funktionen einiger der in großer Anzahl vorkommenden Basalmembran Bestandteile sind mehr oder weniger gut bekannt. Im Folgenden sollen die vier wichtigsten Molekule kurz beschrieben werden (35,52-54).

Das sehr wichtige Glykoprotein Laminin vermittelt den Kontakt von Basalmembranen mit Zellen. Es besitzt eine Multidomanenstruktur, hat ein Molekulargewicht von ca. 900kDa und besteht aus drei uber Disulfidbrucken verknupften Untereinheiten, der A-, der B1- und der B2-Kette. Laminin zeigt im Elektronenmikroskop eine asymmetrische Kreuzstruktur mit einem langem Arm von 77nm Lange und drei kurzen Armen von je 36nm Länge. Die stabchenformigen, kurzen Arme tragen je zwei globulare Bereiche an ihren Enden, der lange Arm endet in nur einer globularen Domane. Einigen dieser strukturellen Domänen konnten biologische Funktionen zugeordnet werden. So enthalt Laminin Bereiche, welche an Tumorzellen oder Hepatozyten binden, weiterhin Bindungsstellen für Heparin und Typ IV Kollagen (55), aber auch Segmente, welche das Neuritenwachstum fordern (Reviews s.56-59).

Die Struktur des Glykoproteins Nidogen (150kDa) ist noch nicht vollstandig bekannt. Es bindet an Laminin und ist wahrscheinlich an der Ablagerung und Organisation der Basalmembranen beteiligt (63,64).

Heparansulfat Proteoglykane, welche aus einem Core-Protein

und an dieses kovalent gebundene Heparansulfat Polysaccharidketten bestehen, sind mit der Basalmembran durch Affinitäten zu Typ IV Kollagen, Laminin und Nidogen verankert und bilden dort eine geladenen Barriere. Sie wirken so z.B. in den Nierenglomeruli als ionenspezifischer Filter für Makromoleküle (65).

In der lamina densa konnte immunhistochemisch als Hauptbestandteil das Basalmembranenkollagen Typ IV lokalisiert werden (38,39). Den Aufgaben dieser Membran entsprechend, hat dieser Kollagentyp eine ganz andere makromolekulare Struktur und räumliche Organisation als die fibrillenbildenden Kollagene. Es bildet ein Netzwerk, welches uber die N- und C-terminalen Enden zusammengehalten wird (s.Abb.5).
Die Aufklärung der Struktur des Typ IV Kollagens war sehr schwierig, da sich Basalmembranen als absolut unlöslich herausstellten. Erst nach Reduktion der intermolekularen Disulfidbrucken und unter stark denaturierenden Bedingungen konnten polymere Verbindungen isoliert werden, die jedoch eine Untersuchung ohne weitere Fragmentierung nicht erlaubten. Erste Anhaltspunkte für die Struktur des Typ IV Kollagens wurden mit dem Elektronenmikroskop erhalten. So führte eine kurze Pepsinbehandlung durch Abbau der NC1-Domäne zu tetramerem Typ IV Kollagen, welches vier über ihre 30nm langen, identischen Enden zusammengehaltene Moleküle darstellt (Abb.4a) (41).
Eine intensivere Pepsinbehandlung zerstörte die langen Arme der Tetrameren und ließ nur die 30nm lange Quervernetzungs-

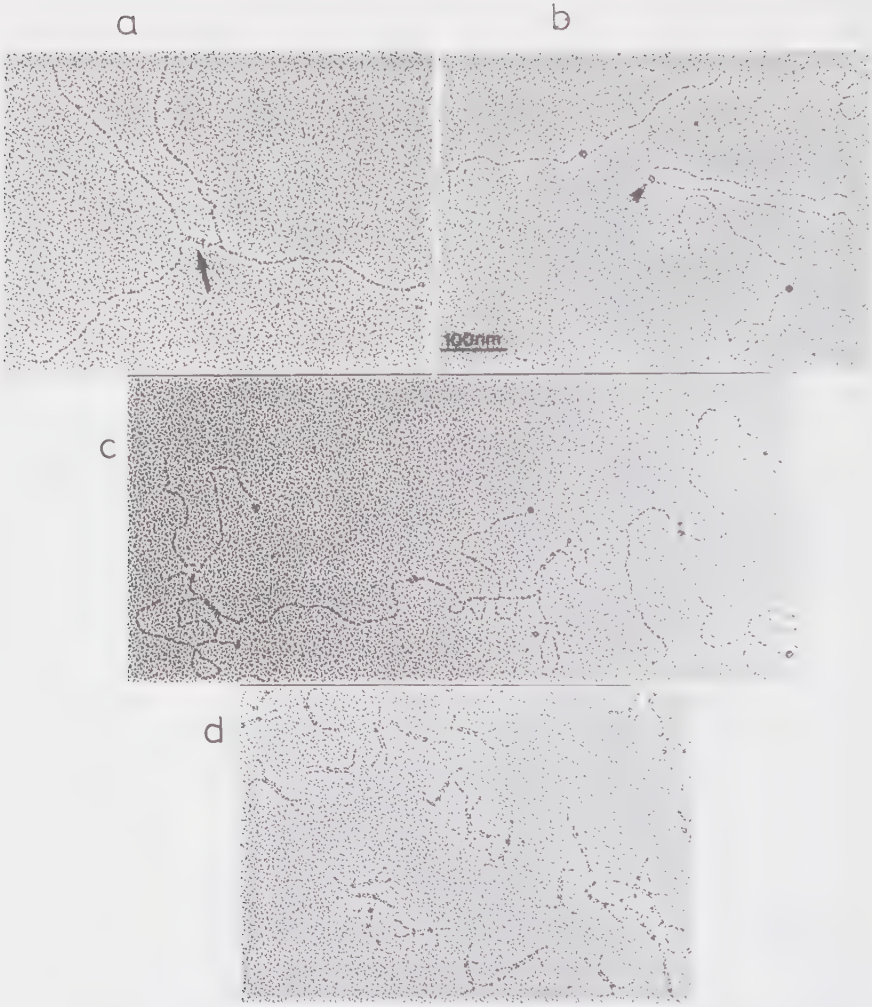


Abb.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit verschiedenen Methoden isolierten Typ IV Kollagen-Fragmenten:
a. Pepsin behandelt (Typ IV Tetramere), aus Plazenta;
b. und c. Essigsäure extrahiert, aus Maus Tumor;
d. Pepsin oder Kollagenase behandelt (7sL), aus Plazenta;
→ 7s-Domäne, ► NC1-Domäne.

domäne mit vier 28nm langen Armen intakt (40) (Abb.4d). Dieses Fragment wurde zunachst aufgrund seiner Sedimentationskonstante als 7s-Kollagen bezeichnet (45). Weitere Fortschritte erbrachte eine essigsaure Extraktion aus Maus Tumor Gewebe, womit dimere, über eine globuläre Domane verknupfte Molekule isoliert werden konnten (Abb.4b). Teilweise erkannte man dabei auch Moleküle, die an einem Ende die 7s-Domäne und am anderen die globuläre Domäne enthielten (Abb.4c). Mit diesen Bildern konnte nun das in Abbildung 5 dargestellte Modell fur die makromolekulare Struktur des Typ IV Kollagens rekonstruiert werden, worin einzelne, 390nm lange Typ IV Kollagen Moleküle durch Quervernetzungen uber ihre identischen Enden ein nicht fibrilläres Netzwerk aufbauen (40,41).

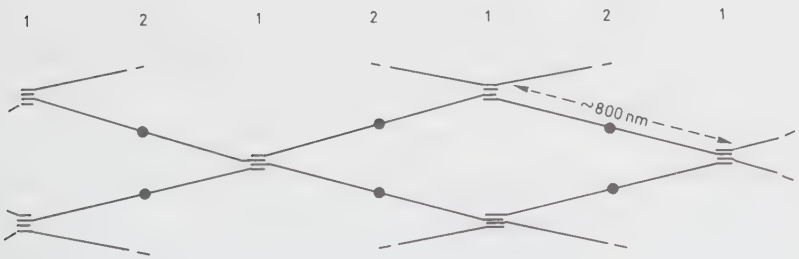


Abb.5 Modell der Netzwerkorganisation des Typ IV Kollagens. Die Art der Quervernetzungen führt zu einem zweidimensionalen Netzwerk.
1 = 7s-Domäne
2 = NC1-Domäne

Das aus Zellkulturmedien isolierte, genuine Molekul bestatigte das durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gewonnene Modell. Es ist insgesamt 390nm lang, besteht aus zwei genetisch distinkten α-Ketten von je 1670 Aminosauren in der Zusammensetzung $\alpha 1(IV)_2 \alpha 2(IV)$ und enthalt drei Domanen, die zentrale Tripelhelix und die beiden terminalen Aggregations und Quervernetzungsbereiche, die 7s- und die NC1-Domane (42-44). Der im Zentrum des Molekuls liegende tripelhelikale Bereich (41) ist 330nm lang, macht etwa 3/4 der Masse des gesamten Moleküls aus und zeigt im Elektronenmikroskop einige Knicks, fur die Unterbrechungen der Gly-Xaa-Yaa-Triplettsequenz verantwortlich sind (46,47). Diese Unterbrechungen variieren in ihrer Lange zwischen einer und elf Aminosauren und verleihen der Tripelhelix eine gewisse Flexibilitat, welche fur die biologischen Funktionen der Basalmembran notig ist (Netzwerkbildung, Dehnbarkeit). Weiterhin erklaren diese Unterbrechungen die Proteaselabilitat des Typ IV Kollagens, welches bei Proteasebehandlung in mehrere Fragmente zerfallt (48-50).

Am N-terminalen Ende des Molküls ist die 30nm lange, tripelhelikale Quervernetzungsdomane lokalisiert, uber die sich bei der extrazellularen Aggregation vier Molekule zusammenschließen (41). Die sogenannte 7s-Domane besitzt einen hohen Gehalt an Cysteinen, welche nach Aggregation intermolekulare Disulfidbrucken ausbilden. Durch den hohen Grad an Quervernetzungen erhalt der tetramere, 30nm lange 7s-Uberlappungsbereich im Vergleich zur zentralen Tripelhelix eine erhohte Stabilitat, was sich in einer

Denaturierungstemperatur von 70°C und in einer Resistenz auch gegen intensive Proteasebehandlung zeigt. Diese erhohte Resistenz gegen Pepsin wurde zur Isolierung der 7s-Domane aus Gewebe benutzt (s. Kap. 3.1.1.).

Als dritte Domane des Typ IV Kollagens befindet sich am C-Terminus des Molekuls ein nicht-kollagener, globulraer Bereich, die NC1-Domane. Sie konnte durch Verdau der gesamten Tripelhelix mit Kollagenase aus dem Gewebe isoliert werden und besteht als Bindeglied zwischen zwei Typ IV Kollagen Molekulen aus sechs NC1-α-Kettenfragmenten (51). Ein hoher Gehalt an Cystein deutet auf inter- und/oder intramolekulare Disulfidbrücken hin, welche wahrscheinlich, durch nicht reduzierbare Quervernetzungen unterstützt, die Quervernetzung zweier Typ IV Kollagen Molekule bewerkstelligen.
Zu Beginn dieser Arbeit war nicht sicher, ob Typ IV Kollagen nach seiner Synthese und nach Ausschleusen aus der Zelle prozessiert wird. Wenn überhaupt, werden nur kurze Peptide am N- und/oder C-Terminus abgespalten.

Die Hauptbestandteile der Basalmembran, Typ IV Kollagen, Laminin, Heparansulfat Proteoglykan und Nidogen, zeigen Interaktionen mit sich selbst und untereinander (55,64, 66-68). Aus dieser Tatsache konnte ein Modell für die Organisation der Basalmembran aufgestellt werden, in welchem Typ IV Kollagen ein gitterähnliches, dreidimensionales Grundgerust bildet. An dieses bindet Laminin, nachdem es

Polymere gebildet hat. Heparansulfat Proteoglykan lagert sich raumfullend in dieses Netzwerk ein, wobei es Laminin und Typ IV Kollagen Molekule sowohl homolog als auch heterolog verbruckt. Die Rolle des Nidogen in diesem Modell ist noch unklar (69).
Die Verbindung der Basalmembran mit den anliegenden Zellen erfolgt uber spezifische, in der Plasmamembran verankerte Rezeptoren fur Laminin, Fibronektin und/oder Typ IV Kollagen oder mit zell-assoziierten Heparansulfat Proteoglykanen (70-72).

Bei verschiedenen Erkrankungen der Niere, des Gefaßsystems und der Haut sind die Basalmembranen in Mitleidenschaft gezogen. In gewissen Stadien von Diabetes melitus tritt eine Verdickung der Basalmembran der Niere auf, was durch erhohte Typ IV Kollagen Synthese, seine Ablagerung in die Basalmembran und einen Verlust an Proteoglykanen hervorgerufen wird. Dies führt zu Veränderungen der Filtrationseigenschaften der Niere.
Glomerulonephritis zeigt ähnliche Storungen der Nierenfunktion. Diese Erkrankung wird unter anderem durch Autoimmunreaktion gegen die glomerulare Basalmembran ausgelost. Eine spezielle Form dieser Krankheiten ist das Goodpasture Syndrom, welches zu Nierenfehlfunktionen und massiven Lungenblutungen fuhrt. Die antigene Determinante dieser Autoimmunreaktion liegt in der globularen NC1-Domane des Typ IV Kollagens (73).
Fur die Tumorinvasion und -metastasierung stellen die Basalmembranen zunachst eine Barriere dar. Allerdings

besitzen einige Tumor-Zellen die Fähigkeit, an die Basalmembran zu binden und diese partiell zu degradieren. Danach können sie in die darunterliegende Matrix eindringen und Sekundärtumore erzeugen.

2. Aufgabenstellung

Fur die Ausbildung der makromolekularen Netzwerkstruktur des Typ IV Kollagens sind die beiden terminalen Bereiche, die 7s-Domäne sowie die NC1-Domäne verantwortlich.

Ziel der Arbeit war es, die Struktur dieser beiden Domanen aufzuklaren, um einen besseren Einblick in den Mechanismus der Aggregation und der darauffolgenden Quervernetzungsreaktion zu erhalten.

Hierzu sollten im einzelnen folgende Schritte durchgefuhrt werden:

1. Isolierung der Typ IV Kollagen Quervernetzungsdomanen 7s und NC1 aus menschlicher Placenta durch limitierte Pepsin- bzw. Kollagenasebehandlung.

2. Isolierung der monomeren α1(IV) und α2(IV) Kettenfragmente der 7s- und der NC1-Domäne, sowie Bestimmung der Aminosäuresequenz.

3. Entwicklung von Modellvorstellungen uber die laterale und axiale Anordnung der vier Molekule im 7s-Uberlappungsbereich durch Auswertung der Aminosauresequenz. Festlegung von Cystein- und Lysinresten, die an intermolekularen Quervernetzungen beteiligt sein können.

4. Um einen besseren Einblick in die räumliche Anordnung der α-Ketten in der NC1-Domäne zu erhalten, sollten einmal die intraketten Disulfidbrücken bestimmt werden. Zum zweiten sollte versucht werden, die Cysteinreste zu finden, die an interketten Bindungen beteiligt sind.

3. Ergebnisse

3.1. 7s - Quervernetzungsdomane

Das sogenannte 7s-Kollagen besteht aus vier 7s-Domanen, die auf einer Lange von 30nm miteinander uberlappen und durch einen hohen Anteil an Disulfidbrucken und nicht reduzierbaren Quervernetzungen miteinander vernetzt sind. Es ist daher außerst resistent gegen Proteasen und kann so, ausgehend von Typ IV Kollagen-Tetrameren, durch intensiven proteolytischen Abbau, der die tripelhelikale Domane zerstort, hergestellt werden. Abhängig von der Intensität einer solchen Proteasebehandlung entsteht das 7s-Kollagen in zwei verschiedenen Formen: in der langen Form, 7sL-Kollagen, und in der kurzen Form, 7sS-Kollagen. Diese beiden Formen des 7s-Kollagens unterscheiden sich darin, daß 7sS nur aus dem 30nm langen Uberlappungsbereich besteht, wahrend das 7sL zusatzlich noch vier etwa 28nm lange, tripelhelikale "Arme" besitzt, wie in der elektronenmikroskopischen Aufnahme von Abbildung 4d (S.12) zu sehen ist (40,74).

Ein Teil der Aminosauresequenz der α1(IV) und α2(IV) Kettenfragmente des 7s-Kollagens war bereits durch einen chinesischen Gast, Dr. Qian aufgeklart . Dazu hatte er die α1- und α2-Ketten der 7s-Domane mit BrCN (CB), Trypsin (T), S. aureus V8 Protease (SP) und verdunnter Salzsaure (AH) gespalten, die entsprechenden Peptide isoliert und wie in Abbildung 6A dargestellt, deren N-Termini sequenziert. Von der α1-Kette wurden so 192 zusammenhangende Aminosaure-

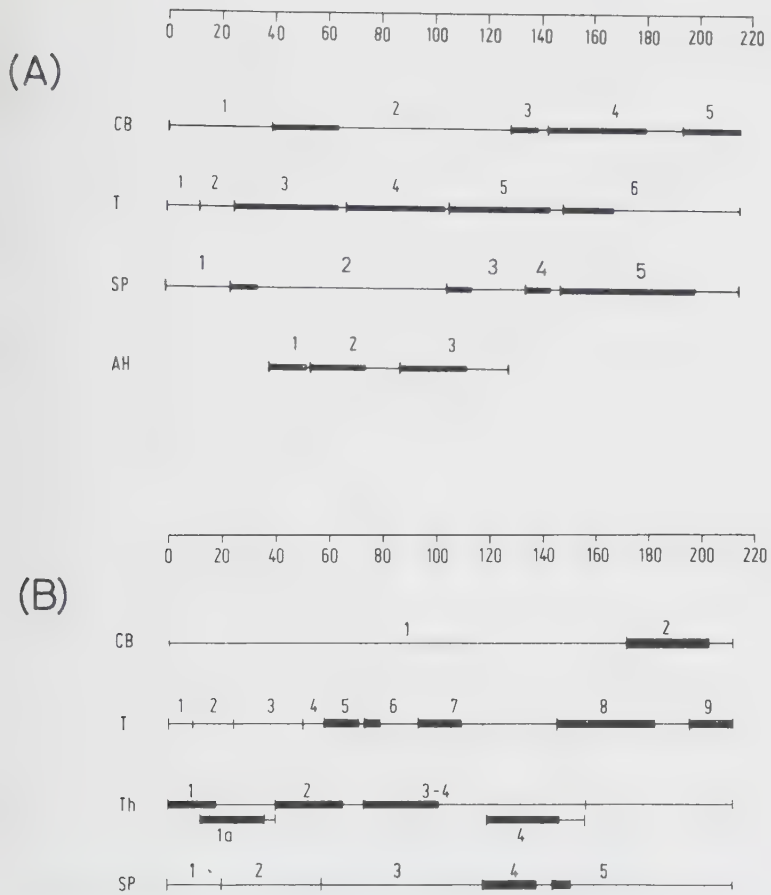


Abb.6 Schematische Darstellung der Positionen der von Qian mit BrCN (CB), Trypsin (T), S. aureus V8 Protease (SP), verdünnter Säure (AH) und Thermolysin (Th) hergestellten Peptide von α1(IV)7s (A) und von α2(IV)7s (B).

sequenzen erhalten. Nur der N-terminale Bereich, auf etwa 30 Aminosäuren geschätzt, war noch unklar.
Ähnliche Untersuchungen wurden auch bei der α2-Kette der 7s-Domäne durchgeführt. Wie in Abbildung 6B gezeigt (s.a.Abb.16, S.36), wurde die Kette bis auf drei Lücken aufgeklärt, welche die Sequenz in vier Blöcke aufteilten. Von diesen vier Blöcken waren die Positionen der beiden mittleren unsicher. Der N-terminale Block war in seiner Position durch Sequenzvergleich mit der gesamten Kette definiert. Der C-terminale Block war gesichert durch das Auftreten von CB2, dem C-terminalen BrCN-Peptid der α2-Kette in langer Form.

Bei den von Qian ermittelten Sequenzen waren die Positionen der Cysteine und Lysine der α1- und α2-Kette nicht sicher. Das lag daran, daß die Cysteine nach Reduktion der Disulfidbrücken mit Aziridin zum Aminoethylcystein (AEC) derivatisiert wurden und bei der Analyse der PTH-Aminosäuren, die nach Edman Abbau entstehen, zwischen PTH-AEC und PTH-Lysin nicht unterschieden werden kann. Deshalb wurden im Folgenden freie SH-Gruppen mit dem Na-Salz der Jodessigsäure (JAcONa) carboxymethyliert.
Für die Aufklärung der N-terminalen Sequenzen von α1(IV)7s, die Schließung der Sequenzlücken von α2(IV)7s und die Absicherung der Cysteine und Lysine beider Ketten mußten zunächst die α1- und die α2-Ketten des 7s-Kollagens isoliert werden.

3.1.1. Herstellung des 7s-Kollagens

Für die Herstellung des 7s-Kollagens diente menschliche Plazenta als Ausgangsmaterial. Aus ihr wurde während eines Zweistufenprozesses in Anlehnung an eine Methode von Risteli et.al. (45) das 7s-Kollagen isoliert.
In der ersten Stufe wurden mit einer milden Pepsinbehandlung (1:1000, 16h, 25°C) die NC1-Quervernetzungsdomänen des Typ IV Kollagen Netzwerkes zerstört und dadurch Typ IV Tetramere aus dem Gewebe freigesetzt. Die Ausbeute an Tetrameren konnte durch Wiederholung dieses Prozesses mit dem noch ungelösten Material gesteigert werden. Das in Lösung gegangene Typ IV Kollagen wurde anschließend durch zweifach fraktionierte Fällung mit NaCl von anderen Proteinen abgetrennt. Es ergaben sich 1-1.5g Typ IV Kollagen pro kg nasser Plazenta. Im Elektronenmikroskop erkennt man tetramere Typ IV Kollagen Moleküle, welche über ihre N-Termini zusammengehalten werden (s.Abb.4a, S.12).
Um die Sequenzierung von α1(IV)7s und α2(IV)7s zu erleichtern, wurde 7s-Kollagen in langer und kurzer Form hergestellt. Wie beschrieben (40), lassen sich 7sS und 7sL durch verschieden intensive Enzymbehandlungen bei 25° bzw. 37°C darstellen. So führte die milde Kollagenasebehandlung (1:100, 24h, 25°C) zu reinem 7sL-Kollagen, das aufgrund seines hohen Molkulargewichtes leicht von Abbaupeptiden der tripelhelikalen Domäne abgetrennt werden konnte. Nach einem Kollagenaseverdau bei 37°C zeigte sich im Elektronenmikroskop jedoch kein einheitliches 7s-Kollagenpräparat, sondern

ein Gemisch aus 7sL und 7sS. Daher wurde versucht, die kurze Form des 7s-Kollagens durch intensive Trypsinbehandlung herzustellen. Das beste Ergebnis wurde erzielt mit 4% Trypsin und einem Puffer von 0.5M CaCl, 50mM Tris, pH 8.1 bei 45°C fur 24h. Nach Reinigung uber eine Agarose 5.0m

Abb.7 Elektronenmikroskopische Aufnahme von mit Trypsin hergestelltem 7sS.
Vergrößerung 1:150000.

Säule wurden aus etwa 1-1.5g Typ IV Tetrameren 70-120 mg 7sS-Kollagen erhalten. In Abbildung 7 erkennt man die Reinheit dieses 7sS-Kollagen Materials in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme.

Die Elektropherogramme der beiden 7s-Kollagen Formen sind in

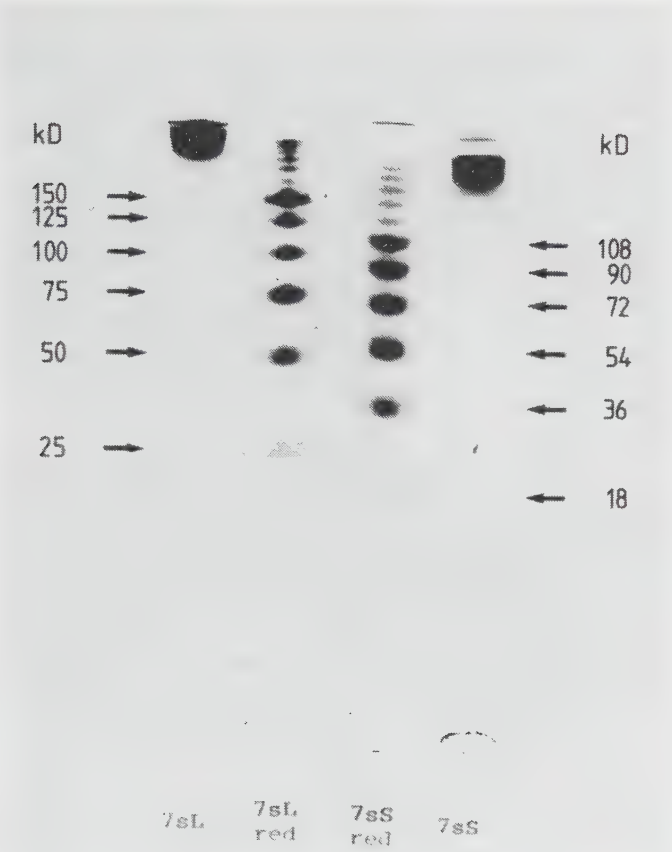


Abb.8 Elektropherogramm von 7sL- und 7sS-Kollagen vor und nach Reduktion.
5%ige Gele; Reduktion mit 10% β-Merkaptoethanol, 60°C, 1h;

Abbildung 8 wiedergegeben. In nicht reduziertem Zustand liegt das Molekulargewicht von 7sS-Kollagen bei etwa 200kDa und das von 7sL-Kollagen bei etwa 300kDa. Nach Reduktion zeigte sich neben geringen Mengen monomerer α-Kettenfragmen-

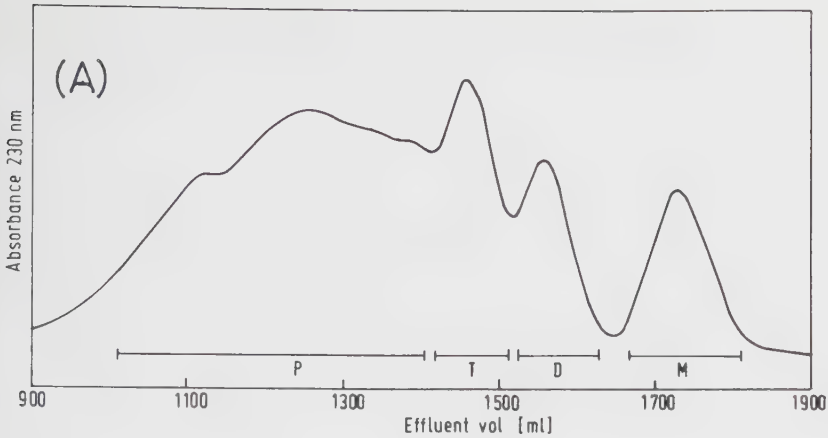
ten mit Molekulargewichten von 18 bzw. 25kDa eine Leiter von Polymeren, Dimere bis Dodekamere, welche auf nicht reduzierbare intra- und intermolekulare Quervernetzungen zurückzufuhren sind. Zur Sequenzanalyse mußten monomere Kettenfragmente zunachst voneinander getrennt werden.

3.1.2. Isolierung der α1(IV)- und α2(IV)-Ketten des 7s-Kollagens

Um in diesem kompakten, stark quervernetzten Molekul samtliche Disulfidbrucken zu spalten, wurde zunachst mit $NaBH_4$ in schwach alkalischer Losung und anschließend unter denaturierenden Bedingungen mit DTT in 6M Guanidiniumhydrochlorid/ 0.05M Tris reduziert. Zum Schluß wurden die freien SH-Gruppen mit JAcONa alkyliert.

Die Trennung der Untereinheiten des so behandelten 7s-Kollagens konnte durch Chromatographie an Agarose 5.0m oder 1.5m durchgeführt werden und ist als Beispiel fur 7sS-Kollagen in Abbildung 9A dargestellt. Die Fraktion, welche die monomeren α-Ketten enthalt (Fraktion M, Abb.9A) wurde mittels einer C18 reversed phase HPLC Saule in seine Komponenten aufgetrennt (Abb.9B). Das Profil der Trennung der Monomer Fraktion von 7sS gleicht dem von 7sL (75). α2(IV)7sS, welches schneller eluiert, war mengenmaßig immer weniger vertreten als das spater eluierende α1(IV)7sS.

Aus 100mg 7sS konnten etwa 12mg Monomere bzw. 8mg α1(IV)7sS und 2.7mg α2(IV)7sS hergestellt werden.



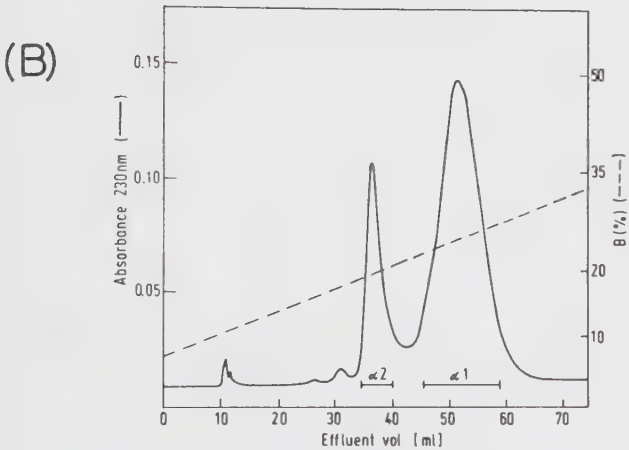


Abb.9 Isolierung von α1(IV)7sS und α2(IV)7sS aus reduziertem und carboxymethyliertem 7sS-Kollagen.

(A) Chromatographie der 7s-Untereinheiten auf Agarose 5.0 in 1M $CaCl_2$, pH 7.5.
M = monomere Untereinheiten (18kDa)
D = dimere Untereinheiten (36kDa)
T = trimere Untereinheiten (54kDa)
P = polymere Untereinheiten (>54kDa)

(B) Rechromatographie der Monomer Fraktion aus (A). Bezeichnet sind die Fraktionen der α-Ketten von 7sS-Kollagen.
Bedingungen:
Vydac TP-RP18, C18 reversed phase HPLC Säule; linearer iso-Propanol/0.1% TFA Gradient, 55°C;
B = Anteil iso-Propanol im Eluent.

3.1.3. Bestimmung der N-terminalen Sequenz der α1-Kette des 7s-Kollagens

Zunachst wurde versucht, den N-Terminus durch Sequenzierung der gesamten α1-Kette zu identifizieren. Es konnten jedoch weder mit α1(IV)7sL noch mit α1(IV)7sS eindeutige Ergebnisse erziehlt werden. In beiden Fallen ergab die Sequenzanalyse bei jedem Abbauschritt ein unubersehbares Gemisch von PTH-Aminosauren mit hohen Anteilen an Glycin. In einem folgenden Experiment wurde α1(IV)7sL mit Trypsin gespalten und anschließend versucht, das N-terminale Peptid zu isolieren. Die tryptischen Peptide wurden zunachst an zwei hintereinandergeschalteten TSK 2000 Gelfiltrationssaulen getrennt, und anschließend die einzelnen Fraktionen mit einer C18 reversed phase HPLC Saule rechromatographiert (Abb.10A bzw. B). Durch Bestimmung ihrer Aminosaure-zusammensetzung und ihres Molekulargewichtes konnten allen bis auf zwei Fraktionen (A und B, Abb.10A; Tab.2) die bis zu diesem Zeitpunkt schon bekannten tryptischen Peptide T3-T6 (s.Abb.6A, S.21) zugeordnet werden. Abbildung 10B zeigt die Trennung der Fraktion A durch reversed phase HPLC. Die mit T2 bezeichnete Fraktion wurde sequenziert und enthielt, wie spater gezeigt wird, die Positionen 12-24 (s.Abb.15, S.35). Fraktion B erwies sich als ein nicht interpretierbares Gemisch von Peptiden. Da die Sequenz von T2 mit dem bei der Sequenzierung des α1(IV)7sS gefundenen Gemisches von PTH-Aminosauren keine Ahnlichkeit zeigte, wurde angenommen, daß es sich bei T2 nicht um das N-terminale tryptische

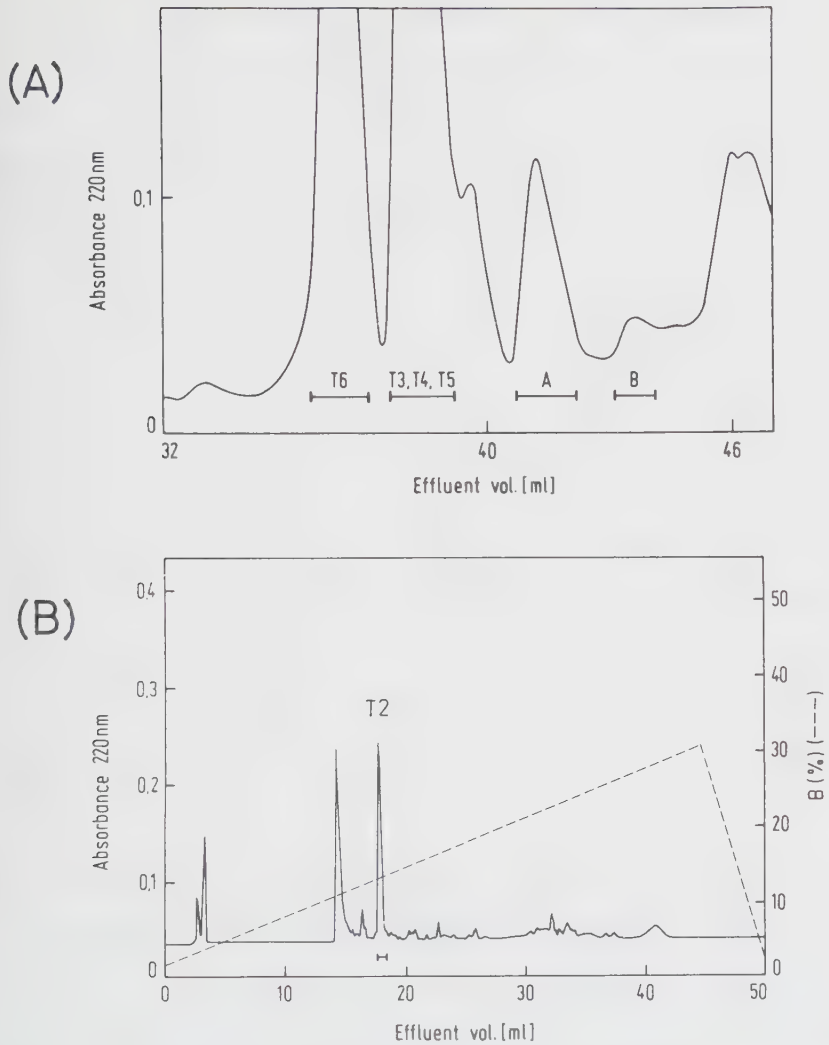


Abb.10 (A) Chromatographie des Peptidgemisches der Trypsinspaltung von α1(IV)7sL an zwei TSK 2000 Gelfiltrationssäulen in 0.2M NH_4OAc/ 0.1%TFA, pH 6.5
Bezeichnet sind die bekannten tryptischen Peptide T3-T6 (s.Abb.6, S.21); A enthält T2, B enthält ein Gemisch von Peptiden.

(B) Profil der Rechromatographie der Fraktion A an einer Vydac TP-RP18. Die mit Balken markierte Fraktion enthält T2.
Bedingungen wie in Abb.9B, S.27.

Peptid handelte. Eine BrCN-Spaltung schien daraufhin fur die Suche des fehlenden, N-terminalen Peptides am geeignetesten zu sein, obwohl das zu erwartende N-terminale BrCN Peptid CB1 aus α1(IV)7sL durch Qian bei Chromatographie an einer Sephadex G75 Saule nicht entdeckt worden war. Es wurde daher

	Frakt.A (T2)	Frakt.B	CB1	6er-Peptid
Hyp	- (-)	- (-)	1.7 (2)	- (-)
Asp	1.0 (1)	- (-)	1.1 (1)	- (-)
Thr	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
Ser	- (-)	1.0 (1)	1.1 (1)	- (-)
Glu	2.2 (2)	- (-)	3.5 (3)	1.1 (1)
Pro	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
Gly	3.7 (3)	6.0 (5)	15.0 (13)	1.2 (1)
Ala	- (-)	1.0 (1)	1.2 (1)	- (-)
Val	1.0 (1)	- (-)	1.3 (2)	- (-)
Cys	1.6 (2)	1.2 (2)	2.7 (4)	- (-)
Met(Hse)	- (-)	- (-)	0.5 (1)	- (-)
Ile	- (-)	- (-)	0.5 (1)	- (-)
Leu	- (-)	- (-)	2.0 (2)	2.0 (2)
Tyr	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
Phe	- (-)	- (-)	1.0 (1)	- (-)
Hyl	2.3 (2)	- (-)	2.2 (2)	1.2 (1)
His	1.3 (1)	- (-)	1.4 (1)	- (-)
Lys	- (-)	2.3 (2)	1.7 (2)	- (-)
Arg	0.7 (1)	0.3 (-)	1.0 (1)	0.8 (1)

Tab.2 Aminosaurezusammensetzung von T2 und Fraktion B aus Abb.10 sowie CB1 und CBC von α1(IV)7s.
Zahlen in Klammern wurden aus der Sequenz berechnet.

das BrCN-Spaltgemisch sowohl von α1(IV)7sL als auch von α1(IV)7sS durch Chromatographie an TSK 2000 Saulen aufgetrennt (Abb.11). Durch Vergleich der beiden Chromatogramme, Rechromatographie an einer C18 reversed phase Saule sowie mit Aminosaurezusammensetzungen der einzelnen Fraktionen konnten die Peptide CB4, CB4-5 und CB5, die sich im C-terminalen Arm des α1(IV)7sL befinden, sowie die Peptide CB2, CB2-3 und CB3, die in der

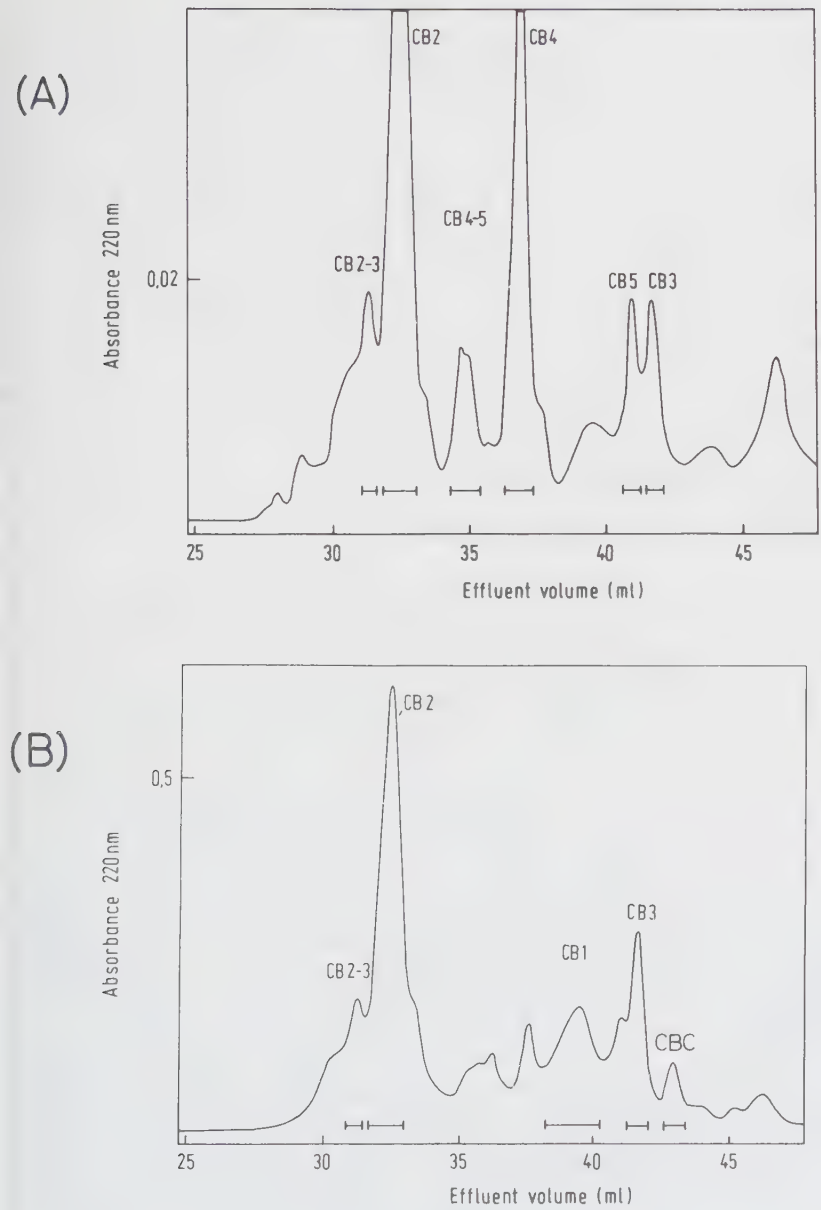


Abb.11 Vergleich der Chromatographien der Peptidgemische nach BrCN-Spaltung von α1(IV)7sL (A) und α1(IV)7sS (B) auf je zwei TSK 2000 Gelfiltrationssäulen. Bedingungen wie in Abb.10A, S.29.

Überlappungsregion lokalisiert sind (s.Abb.6A, S.21), erkannt und den Fraktionen zugeordnet werden. Bei der Suche nach CB1 wurden alle Fraktionen zwischen CB2 und CB3 von α1(IV)7sS an einer C18 reversed phase HPLC Saule rechromatographiert, ihre Aminosaurezusammensetzung bestimmt und sequenziert. Auf diesem Weg zeigte die mit CB1 bezeichnete Fraktion in Abbildung 11B ähnlich wie die gesamte α1-Kette in jedem Abbauschritt hauptsächlich Glycin neben einem charakteristischen Untergrund von anderen Resten. Da die Ausbeute an PTH-Aminosauren der Menge des eingesetzten Peptides entsprach, wurde auf einen heterogenen N-Terminus dieses Peptides geschlossen.

Um dies zu klaren, mußte eine großere Menge dieses BrCN Peptides hergestellt werden. Dazu wurde vom gesamten 7sS-Kollagen ausgegangen, ohne vorher die Polymere zu entfernen und die α1- und α2-Ketten zu trennen. Da α2(IV)7sS kein Methionin enthalt, gibt das BrCN Spaltgemisch, wie in Abbildung 12 zu sehen, nach Trennung an TSK 2000 Saulen ein einigermaßen ubersichtliches Bild. Fraktion A enthalt ungespaltenes α2(IV)7sS. Die schneller eluierenden Fraktionen bestehen aus durch nicht reduzierbare Quervernetzungen verbruckten, polymeren BrCN-Peptiden. Die kleineren BrCN-Peptide des α1(IV)7sS waren in den langsamer eluierenden Fraktionen zu finden. So enthalt Fraktion B α1(IV)7s CB2, wahrend α1(IV)7s CB1 auf Grund seines hohen Gehaltes an Cystein, Lysin und Hydroxylysin (Tab.2, S.30) in Fraktion C lokalisiert wurde. Nach einigen Versuchen gelang es, Fraktion C durch Chromatographie an einer C4 reversed

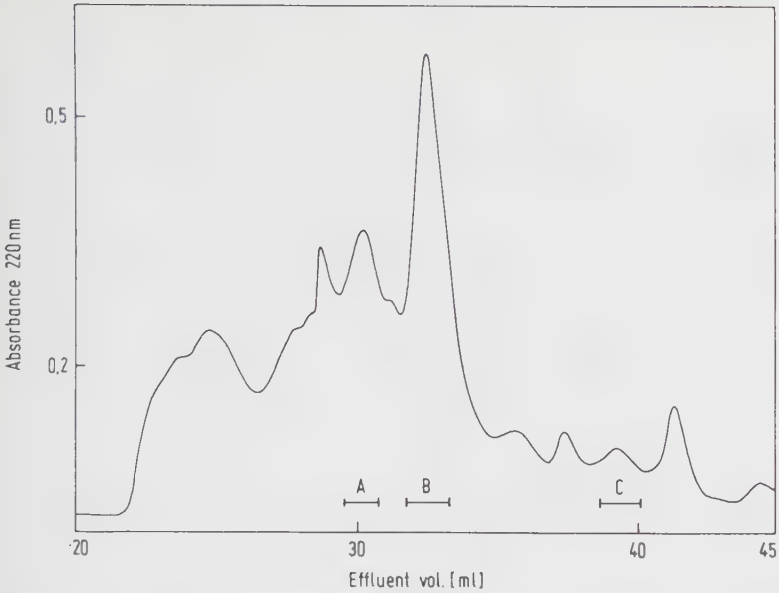


Abb.12 Chromatographie des Peptidgemisches der BrCN-Spaltung von reduziertem und carboxymethyliertem 7sS mit zwei TSK 2000 Gelfiltrationssäulen.
Fraktion A enthält α2(IV)7sS (ungespalten);
Fraktion B enthält α1(IV)7s CB2;
Fraktion C enthält α1(IV)7s CB1.
Bedingungen wie in Abb.10A, S.29.

phase HPLC Saule und einem Acetonitril Gradienten in vier Peaks aufzulosen (Abb.13). Die Aminosäurezusammensetzung dieser Fraktionen 1-4 zeigte, daß diese Peaks sehr ähnliche Peptide enthielten. Die Sequenzanalyse ergab für die Peptide von Fraktion 1 und 3 eine gleiche Sequenz. Sie unterscheidet sich von den Peptiden in Fraktion 2 und 4, die ebenfalls gleich waren, durch einen zusätzlichen N-terminalen Lysin-Rest. Die Auftrennung der beiden Peptide in je zwei Fraktionen kann auf das Homoserin am C-Terminus der BrCN-Peptide zurückgeführt werden, das zum Teil als Homoserinlakton vorliegt.

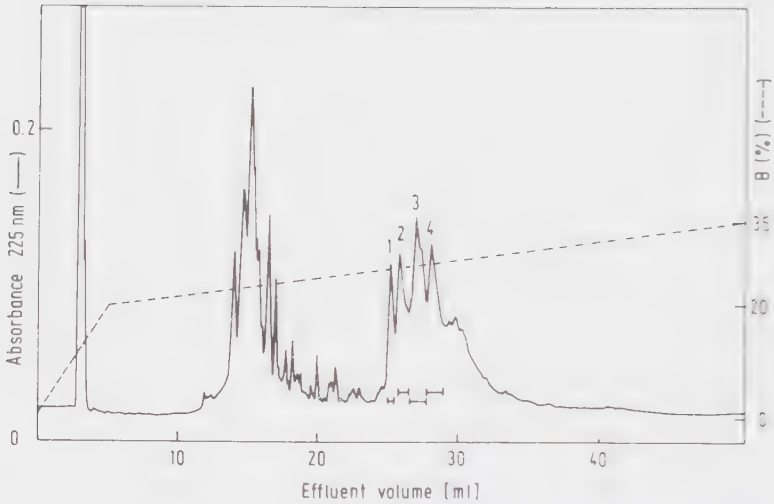


Abb.13 Chromatographie von CB1 α1(IV)7s (Fraktion C aus Abb.12) an einer reversed phase HPLC Säule.
Bedingungen:
Baker C4 reversed phase HPLC Säule;
linearer Acetonitril/0.1% TFA Gradient, 55°C;
Fraktion 1-4 siehe Text.

In Abbildung 14 sind beide Sequenzen untereinandergeschrieben dargestellt. Es wurde nun klar, warum bei Sequenzierung eines Gemisches dieser beiden Peptide bis zu Schritt 10 in jedem Schritt Glycin zu sehen war. Bei der Suche nach CB1 trat bei der in Abbildung 11B (S.31)gezeigten Molekularsiebchromatographie des BrCN-Peptidgemisches ein sechs Aminosauren langes Peptid, CBC auf. Es konnte durch seine Zusammensetzung (Tab.2, S.30) als C-terminales Peptid von α1(IV)7sS identifiziert werden und entspricht somit den

```
    1                   5                   10
A   Lys Gly Gly Cys Ala Gly Ser Gly Cys Gly Lys Cys Asp Cys
B   Gly Gly Cys Ala Gly Ser Gly Cys Gly Lys Cys Asp Cys His
```

Abb.14 N-terminale Sequenzen von CB1 α1(IV)7s. Die Peptide beginnen um eine Aminosaure versetzt. Sequenzierung eines Gemisches dieser beiden Peptide ergibt bis zu Position 10 in jedem Schritt Gly.
A Fraktionen 1 und 3 aus Abb.13
B Fraktionen 2 und 4 aus Abb.13

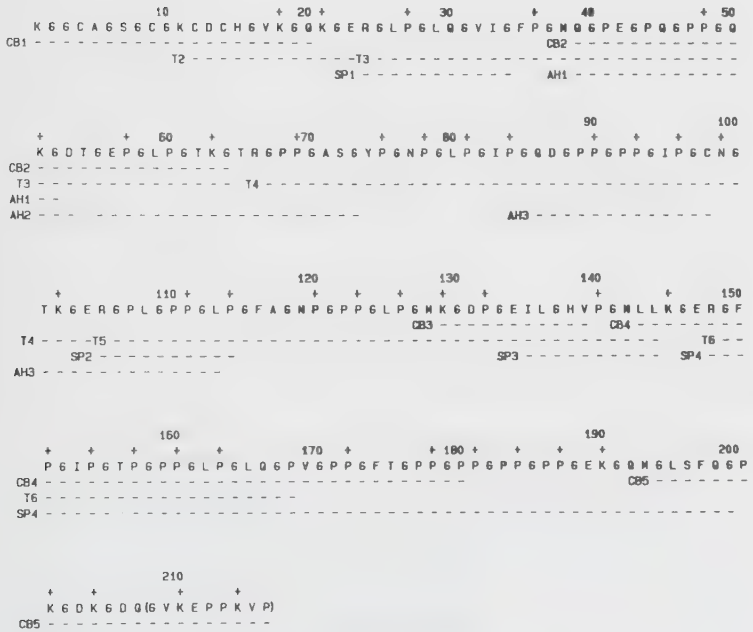


Abb.15 Vollstandige Sequenz der α1-Kette der 7s-Domäne in langer Form.
Gezeigt sind die Positionen der sequenzierten Peptide CB1 und T2 sowie die der BrCN- (CB), Trypsin- (T), V8-Protease- (SP) und Säurehydrolyse- (AH) Peptide von Qian.
$\overset{\star}{P}$ = Hydroxyprolin
$\overset{\star}{K}$ = Hydroxylysin
$\overset{\star}{N}$ (Pos.99) = glykosyliertes Asparagin

ersten sechs Aminosauren von CB4 α1(IV)7sL (Abb.15, Pos.143-148). Hiermit war das C-terminale Ende des tryptisch hergestellten α1(IV)7sS mit Arginin in Position 148 festgelegt.
Die gesamte Sequenz der α1-Kette (IV)7sL ist in Abbildung 15 dargestellt.

3.1.4. Sequenzanalyse von α2(IV)7s

Wie aus Abbildung 6B (S.21) ersichtlich, waren durch die Arbeit von Qian mit Hilfe der thermolytischen Peptide Th1 und Th1a 36 Aminosaurepositionen des N-Terminus von α2(IV)7s bekannt. Jedoch konnten die Positionen 1, 6, 11, 15 und 17,

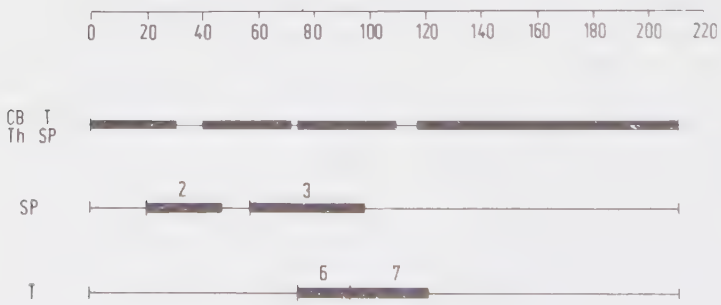


Abb.16 Schematische Darstellung der Peptidpositionen von α2(IV)7s.
Die erste Zeile zeigt die von Qian ermittelte Sequenz.
Zeile 2 und 3 gibt die Positionen der die Lücken schließenden Peptide SP2, SP3, T6 und T7 an.

wegen der Blockierung der Cystein-Reste mit Aziridin und der daraus resultierenden Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen PTH-Lysin und PTH-Aminoethylcystein nicht eindeutig bestimmt werden (vgl. Kap. 3.1.).

Nach Carboxymethylierung der Cystein-Reste konnte jedoch durch Sequenzierung der wie in Kapitel 3.1.2. behandelten und isolierten, gesamten α2-Kette des 7sS-Kollagens jeder Schritt eindeutig zugeordnet werden. Position 1 ist mit Lysin und die Positionen 6, 11, 15 und 17 sind mit Cysteinen besetzt (s.Abb.19, S.41).

Wie aus Abbildung 16, oberste Zeile hervorgeht, waren zur Aufklarung der gesamten Aminosäursequenz der α2-Kette der 7s-Domane neben den Unsicherheiten am N-terminalen Ende noch drei Lucken zu schließen, um so die Blocke miteinander zu verbinden. Dazu bot sich eine V8-Protease Spaltung an. Um schneller und direkter an α2(IV)7sS-Ausgangsmaterial zu kommen, wurden nicht durch Molekularsiebchromatographie Monomere präpariert und dann in α1- und α2-Ketten aufgetrennt (vgl. Kap. 3.1.2.), vielmehr wurde vom gesamten 7sS-Kollagen ausgegangen. Das BrCN-Spaltgemisch dieses Materials, welches die intakte α2-Kette in kurzer Form enthielt, wurde mit TSK 2000 Saulen aufgetrennt (Abb.12, S.33). Durch Nachreinigung der Fraktion A mit einer C18 reversed phase HPLC Saule und Sequenzanalyse wurde die α2-Kette gefunden.

Dieses Material wurde mit V8-Protease gespalten (pH 7.8, 1:30, 37°C, 16h), an TSK 2000 Säulen aufgetrennt (Abb.17a,S.39)

	SP2	SP3	SP4	T6	T7
Hyp	2.1 (2)	6.5 (6)	0.9 (1)	3.0 (3)	2.6 (3)
Asp	2.1 (2)	5.6 (5)	0.5 (-)	1.2 (1)	3.1 (3)
Thr	- (-)	1.8 (2)	1.0 (1)	- (-)	1.7 (2)
Ser	- (-)	2.8 (3)	0.6 (-)	0.8 (1)	2.2 (2)
Glu	4.8 (5)	4.2 (4)	4.6 (5)	1.5 (1)	8.0 (9)
Pro	3.2 (3)	4.5 (4)	4.8 (5)	1.2 (1)	6.7 (7)
Gly	12.0 (13)	22.0 (21)	5.6 (7)	7.7 (8)	14.0(15)
Ala	- (-)	3.3 (3)	1.2 (1)	1.1 (1)	1.3 (1)
Val	1.1 (1)	2.6 (3)	0.2 (-)	1.1 (1)	- (-)
CMC	- (-)	0.2 (1)	- (-)	- (-)	0.8 (1)
Met	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
Ile	- (-)	0.8 (1)	- (-)	0.8 (1)	- (-)
Leu	1.7 (2)	- (-)	1.1 (1)	- (-)	- (-)
Tyr	0.4 (1)	0.2 (1)	0.4 (1)	- (-)	1.1 (2)
Phe	0.9 (1)	0.9 (1)	1.2 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)
Hyl	2.6 (4)	0.9 (1)	2.8 (1)	0.7 (-)	0.8 (1)
His	0.5 (-)	1.3 (1)	0.2 (-)	0.7 (1)	- (-)
Lys	0.2 (-)	- (-)	0.2 (-)	- (-)	0.1 (-)
Arg	2.0 (2)	3.8 (4)	0.3 (-)	0.9 (1)	1.2 (2)

Tab.3 Aminosaurezusammensetzung der Peptide SP2-SP4, T6 und T7 von α2(IV)7s.
Zahlen in Klammern wurden aus der Sequenz berechnet.

und jede Fraktion an einer C18 reversed phase HPLC Saule nachgereinigt. Die Hauptkomponenten der Fraktionen A und B (Abb.17b und c) wurden durch ihre Aminosaurezusammensetzung (Tab.3) als V8-Peptide SP2 und SP3 (s.Abb.6 bzw.19) identifiziert. Durch Sequenzanalyse, 29 bzw. 38 Schritte, konnten die Lücken in Position 37-40 und Position 72 geschlossen werden (s.Abb.16, S.36).

Nach Reduktion des tryptisch hergestellten 7sS-Kollagen und Isolierung der Monomeren trat manchmal bei der Kettentrennung neben den α-Ketten eine Fraktion auf, welche sich als Doppelpeptid T6-7 erwies und wahrscheinlich unter den extremen Bedingungen der Herstellung mit Trypsin trotz weitgehend intakter tripelhelikaler Struktur entstand.

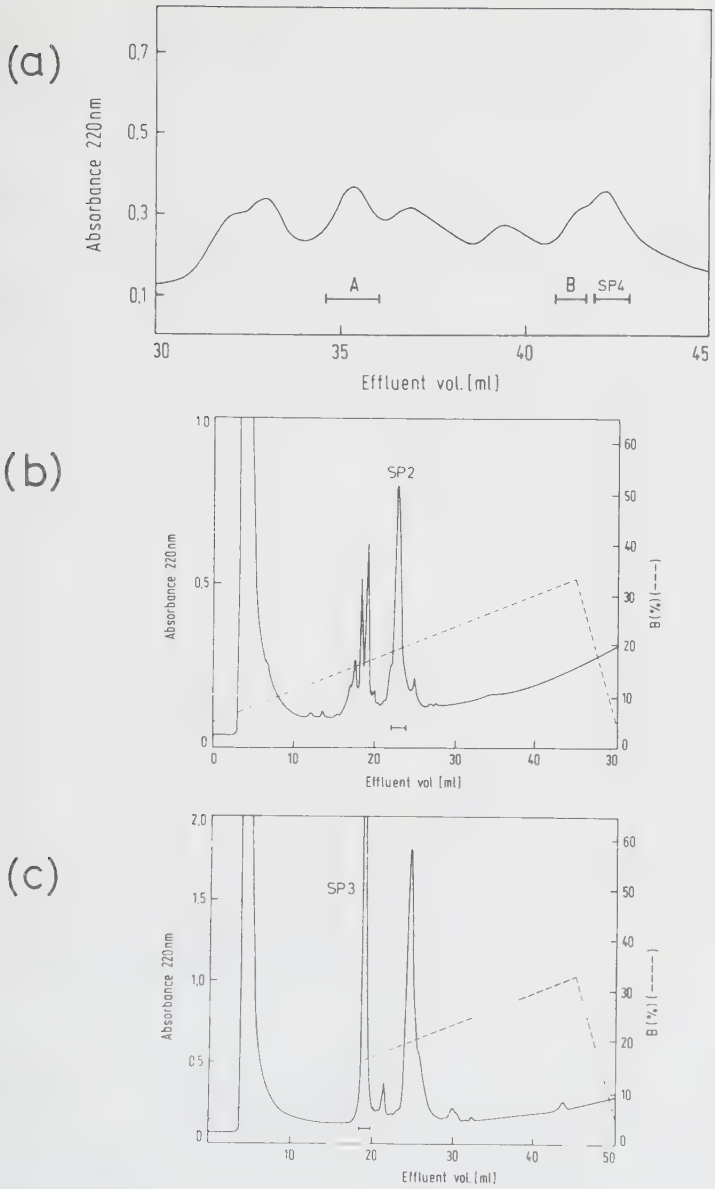


Abb.17 Isolierung der V8-Protease Peptide SP2 und SP3 von α2(IV)7s.
Mit S. aureus V8 Protease gespaltenes α2(IV)7sS wurde mit zwei TSK 2000 Gelfiltrationssäulen aufgetrennt (a). Fraktion A bzw. B wurden mit reversed phase HPLC nachgereinigt (s. (b) bzw. (c)). SP2 und SP3 sind mit Balken markiert.
Bedingungen siehe Abb.9B, S.27.

Dieses Peptid eignete sich zur Schließung der letzten Lucke (Pos. 109-117, s.Abb.6, S.36) von α2(IV)7s. Nach Spaltung von T6-7 mit Trypsin (pH 7.8, 1:30, 37°C, 16h) ergab die Trennung an TSK 2000 Saulen erwartungsgemaß zwei Fraktionen (T6 und T7, Abb.18). Die Aminosaurezusammensetzung (Tab.3) der auf C18 reversed phase HPLC Saule nachgereinigten Fraktionen (nicht gezeigt) bestatigte das Vorliegen der beiden Bruchstucke. Das bereits bekannte Peptid T6 (Pos. 73-93) wurde 15 Schritte, das Peptid T7 (Pos. 94-117) wurde

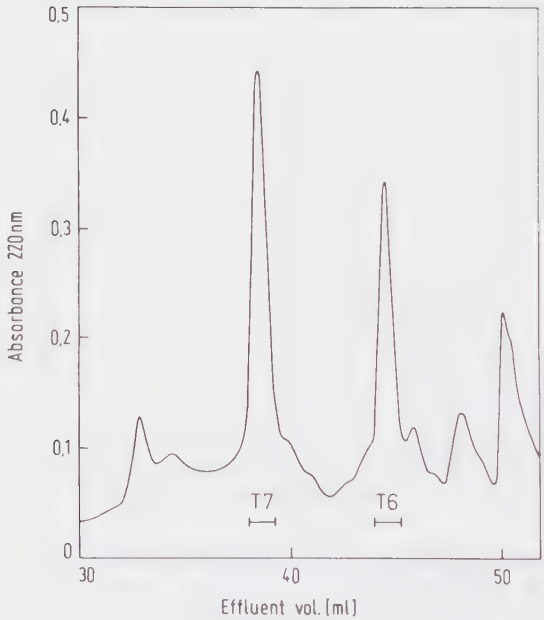


Abb.18 Chromatographie des Peptidgemisches, erhalten nach Trypsinspaltung von T6-7 aus α2(IV)7sS (Pos. 73-143) an zwei TSK 2000 Gelfiltrationssäulen
Bedingungen wie in Abb.10A, S.29.

```
                    10                  20 +         +   30              +40       +      50
     K F D V P C G G R D C S G G C Q C Y P E K G G R G Q P G P V G P Q G Y N G P K G L Q G F P G L Q G R
Chain - - - - - - - - - - - - - - - - - -
                                        SP2 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
  Th1 - - - - - - - - - - - - - - - - - -                                                Th2 - - - - - - - - - -
                    Th1a - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                    60
     +    +         +         +    70            + 80      +    +   90         +    100
     K G D K G E R G A P G V T G P K G D V G A R G V S G F P G A D G I P G H P G Q G G P R G R P G Y D G
          SP3 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
  Th2 - - - - - - - - - - - - - - - - -          Th3-4 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
            T5 - - - - - - - - - - - - - - -T6 - - - - - - - - - - - - - - - - -       T7 - - - - - - -

                                                                                          150
                    110      +       120    +         130              140              +
     C N G T Q G D S G P Q G P P G S E G F T G P P G P Q G P P G Q Q G E P Y A L G K E E R D R Y R G E P
     - - - - - - - -          SP4 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -     SP5 - - - - - - - -
                                Th4 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
  T7 - - - - - - - - - - - - - - - - - - -                                                  T8 - - -

                                                        160
        +         160  +    +      170    +    +    +    +    +    190              200
     G E P G L V G F Q G P P G R P G K V G Q M G P V G A P G R P G P P G P P G P P G Q Q G N R G L G F Y
                                          C82 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
  T8 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -                    T9 - - - - -

        + 205 +    210
     G V K G E K G D V G Q
  C82 - -
  T9 - - - - - - - - - - -
```

Abb.19 Vollständige Sequenz der α2-Kette der 7s Domäne in langer Form.
Gezeigt sind die Positionen der sequenzierten Peptide SP2, SP3, T6 und T7 und des N-Terminus der Kette, als auch die von Qian bestimmten Sequenzen von BrCN- (CB), Trypsin- (T), V8-Protease- (SP) und Thermolysin- (Th) Peptiden.
$\overset{+}{P}$ = Hydroxyprolin
$\overset{+}{K}$ = Hydroxylysin
$\overset{+}{N}$ (Pos.102) = glykosyliertes Asparagin.

über 28 Schritte sequenziert (Abb.19). Dies führte zur Überlappung mit dem Peptid SP4 (s.Abb.6, S.21 bzw. Abb.19) und zur Schließung der letzten Lücke, Pos. 109-117 (s.Abb.16, S.36). Außerdem wurde ein früher in Position 101 identifiziertes Lysin als Carboxymethylcystein erkannt.
Die gesamte Sequenz von α2(IV)7sL ist in Abbildung 19 dargestellt.

3.1.5. Kohlenhydratanalysen

Samtliche Lysine des Typ IV Kollagens in den Positionen Yaa sind hydroxyliert und vollstandig glykosyliert und konnen deswegen nach Sequenzierung nicht direkt identifiziert werden (46,115). An jeder Stelle, die von einem glykosylierten Hydroxylysin besetzt war, konnte daher im Sequenzer keine PTH-Aminosaure gefunden werden. Auf die Anwesenheit von Hydroxylysin in solchen Lucken wurde indirekt aus der Aminosäurezusammensetzung der entsprechenden Peptide geschlossen. In diesem Zusammenhang tauchte bei der Interpretierung der Aminosaurezusammensetzung der Peptide T4 und AH3 aus α1(IV)7s eine Diskrepanz auf. Fur zwei solcher eben beschriebener Lücken zeigte die Aminosaurezusammensetzung des 39 Reste langen T4 ein Hyl zu wenig, dafur aber ein Asp zu viel. Das gleiche galt fur die Aminosaurezusammensetzung des 45 Reste langen AH3. Dies ließ die Vermutung zu, daß in diesem Fall eine N-glykosidisch an Asn gebundene Kohlenhydratkette vorliegt, da glykosyliertes Asparagin ebenfalls nicht als PTH-Asn identifiziert werden kann.
Die gleiche Fragestellung tauchte auch fur α2(IV)7s auf.

Bei der Suche nach Glykopeptiden konnten Levene und Spiro (78) aus der Aorta von Rinderglomeruli nach Kollagenase- und Pronasebehandlung ein Glykopeptid isolieren, dessen Aminosaurezusammensetzung von 5 Gly, 1 Pro, 2 Hyp, 1 Ile, 1 Cys, 1 Asp, 1 Thr, 1 Hyl, 1 Glu und 1 Arg mit den Position 91-105 von α1(IV)7s (vgl.Abb.15, S.35) identisch erschien.

Die Autoren fanden fur dieses Peptid einen Kohlenhydratgehalt von 1 Glukose (Glc), 4 Galaktose (Gal), 3 Mannose (Man), 0.6 Fukose (Fuc), 4 Glukosamin (GlcN) und 0.5 Sialinsaure, was einem glykosylierten Hyl und einem N-glykosidisch an Asparagin gebundenen Heteropolysaccharid vom Mannose reichen Typ entspricht.

Um zu entscheiden, ob die α1-Kette in Position 99 und die α2-Kette in Position 102 ein glykosyliertes Asn besitzen, wurden gesamtes 7sS-Kollagen, bestehend aus zwei α1- und einer α2-Kette, sowie isoliertes α2(IV)7sS einer Kohlenhydratanalyse unterzogen.

(A)

	α2(IV)7sS	7sS
Glukosamin	5	59
Galaktosamin	-	--

(B)

	α2(IV)7sS	7sS
Glukose	5.4	80
Galaktose	6.8	94
Mannose	2.7	32
Fucose	0.6	9
Glucosamin	4.0	45
Galaktosamin	--	--

Tab.4 Kohlenhydratgehalt verschiedener Peptide in Mol pro Mol Protein.
(A) = Hydrolyse der Glykopeptide mit 3N HCl und Analyse mit einem Aminosäureanalysator.
(B) = Hydrolyse der Glykopeptide mit 0.5N HCl, Derivatisierung und Analyse mit kombinierter Gaschromatographie und Massenspektroskopie.

Hierzu wurden zunachst durch Hydrolyse mit 3N HCl nur die Aminozucker quantitativ freigesetzt, welche anschließend mit einem Aminosaureanalysator identifiziert und quantifiziert wurden. Dabei konnten 5 GlcN, aber kein Galaktosamin (GalN) pro Kette festgestellt werden (Tab.4A). Außerdem wurden die Peptide in Anlehnung an Prehm und Scheid (79) mit 0.5N HCl hydrolysiert, mit $NaBH_4$ reduziert, mit Acetanhydrid acetyliert und schließlich mit Hilfe von kombinierter Gaschromatographie und Massenspektroskopie (GC/MS) analysiert. Auf diesem Weg konnten 5 Glc, 7 Gal, 3 Man, 4 GlcN und 0.6 Fuc für α2(IV)7sS festgestellt werden (Tab.4B). Setzt man voraus, daß samtliche Hydroxylysine mit einem Glukosylgalaktosylrest besetzt sind und subtrahiert daher 5 Glc und 5 Gal pro α2-Kette von der Gesamtzuckerzusammensetzung, so bleiben 2 Gal, 3 Man, 4-5 GlcN und 0.6 Fucose pro α2-Kette. Subtrahiert man von der Gesamtzuckerzusammensetzung des 7sS den Anteil an Zucker, den die α2-Kette beitragt und berücksichtigt die Glukosylgalaktosylreste der α1-Kette (d.h. 7 Glc bzw. 7 Gal), so bleibt,fur die α1-Kette die gleiche Zuckerzusammensetzung wie für die α2-Kette, von 2 Gal, 3 Man, 4-5 GlcN und 0.8 Fuc. Diese Zusammensetzung entspricht einem biantennaren Heteropolysaccharid vom Mannose reichen Typ, welcher N-glykosidisch an Asparagin gebunden ist. Er hat folgende bekannte Struktur:

```
                          /Man-GlcN-Gal(-GlcN-Gal)
Asn-GlcN-GlcN-Man
                          \Man-GlcN-Gal
```

Eine Kohlenhydratanalyse von α1(IV)7s T4 (vgl. Abb.15, S.35, Pos. 67-105) zeigte ebenfalls die Komponenten Glc, Man, Gal, GlcN und Fuc in einem annähernd richtigen Verhältnis zueinander. Aus Mangel an Material konnte aber eine genauere Quantifizierung nicht durchgeführt werden.

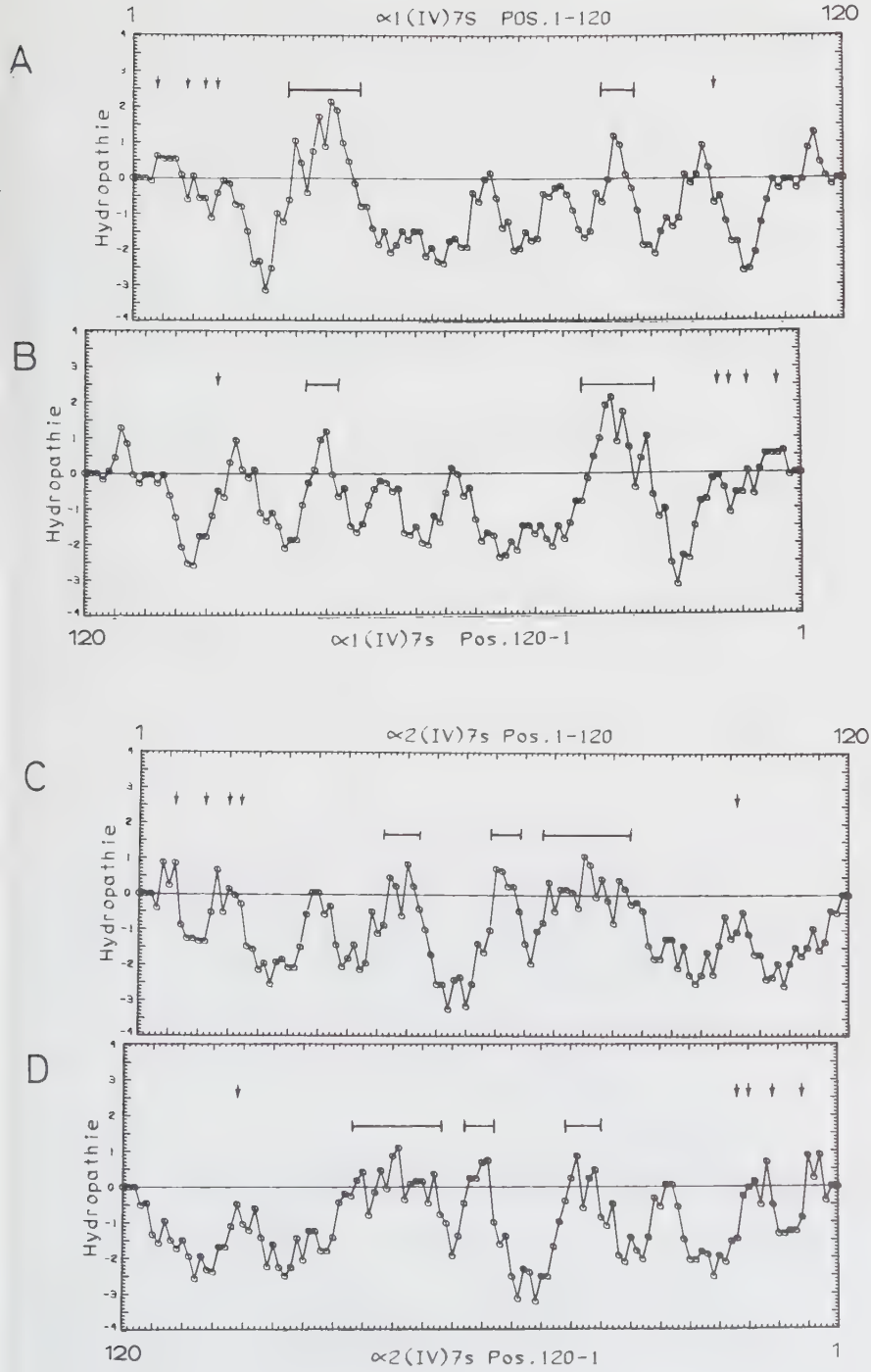
3.1.6. Untersuchung von Interaktionen des 7s-Kollagens mit Hilfe der Primärstrukturdaten

Wie man im Elektronenmikroskop sieht, ist der Überlappungsabschnitt der N-Termini von vier Typ IV Kollagen Molekulen im 7s-Bereich 30nm lang. Um den hohen Quervernetzungsgrad dieser Domäne zu erreichen, mussen die vier Moleküle so zueinander orientiert sein, daß Cysteine und Lysine bzw. Hydroxylysine maximal miteinander reagieren können. Es lassen sich zwei α1-Ketten antiparallel so anordnen, daß Cystein 98 und Hydroxylysin 102 mit Cystein 14 und Lysin 11 reagieren können. Ob dies richtig ist, sollte anhand von Hydropathie- und Interaktionsberechnungen festgestellt werden.

In Abbildung 20 (S.47/48) sind die Hydropathie-Profile von α1(IV)7s und α2(IV)7s (Pos. 1-120), die nach der Methode von Kyte und Doolittle (77) ermittelt wurden, angegeben. Die Balken kennzeichnen die herausragenden hydrophoben Bereiche, die Pfeile markieren die Positionen der Cysteine. Verschiebt man zwei antiparallel angeordnete α1(IV)-Ketten gegeneinan-

der, so erhalt man die beste Übereinstimmung von hydrophoben Bereichen, d.h. eine maximale hydrophobe Wechselwirkung, wenn die Cysteine in Position 98 und 14 miteinander reagieren konnen (s. Abb.20 A und B). Dabei beobachtet man nicht nur eine Interaktion zwischen den starken, mit einem Balken markierten hydrophoben Bereiche, sondern es kommen auch die weniger ausgepragten hydrophoben Abschnitte nebeneinander zu liegen. Bei einem ahnlichen Versuch mit zwei α2(IV)-Ketten ließen sich maximale Wechselwirkungen der hydrophoben Bereiche nicht eindeutig einer einzigen Orientierung zuordnen; vielmehr konnen die Ketten uber einen Bereich von etwa fünf Aminosauren ohne Einbuße an Intensitat der Interaktionen gegeneinander verschoben werden. Eine dieser fünf möglichen Positionen ist die, analog zur optimalen Anordnung der α1-Ketten, bei der Cystein 101 mit Cystein 17 reagieren kann (s. Abb.20, C und D). Wie in Abbildung 20, E und F zu sehen ist, konnte zwischen antiparallel angeordneten α1- und α2-Ketten kein deutliches Maximum gefunden werden.

Fur ein paralleles Alignment findet man selbstverstandlich in allen Fallen eine bessere Überlappung der hydrophoben Bereiche, jedoch wirken dann die geladenen Aminosauren abstoßend und machen solch eine Anordnung unwahrscheinlich.


A
1
∝1(IV)7S POS.1-120
120
Hydropathie
B
Hydropathie
120
∝1(IV)7s Pos.120-1
1
C
1
∝2(IV)7s Pos.1-120
120
Hydropathie
D
Hydropathie
120
∝2(IV)7s Pos.120-1
1

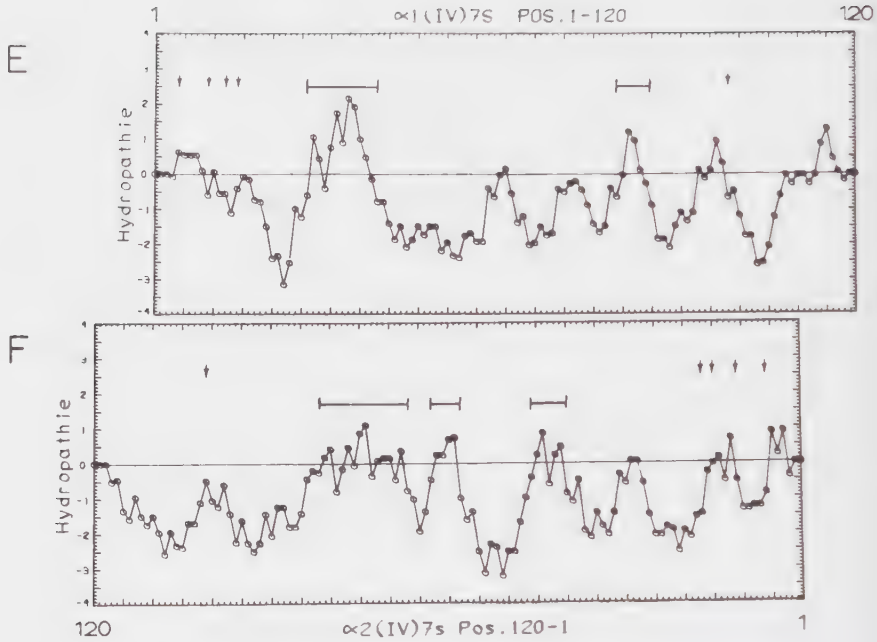


Abb.20 (S.47 und 48) Hydropathie Profile von α1(IV)7s und α2(IV)7s.
Es sind jeweils die Profile zweier antiparalleler α-Ketten so dargestellt, daß die beste Übereinstimmung von hydrophoben Bereichen, d.h. eine maximale Wechselwirkung gewährleistet ist.
Die Hydropathie Berechnungen wurden durchgeführt nach der Methode von Kyte und Doolittle (77); es wurde über fünf Aminosaurereste gemittelt.
(A) = α1(IV)7s, Pos.1-120;
(B) = α1(IV)7s, Pos.120-1 (reverse α1-Kette);
(C) = α2(IV)7s, Pos.1-120;
(D) = α2(IV)7s, Pos.120-1 (reverse α2-Kette);
(E) = (A);
(F) = (D);
Pfeile = Positionen der Cysteine;
Balken = herausragende hydrophobe Bereiche;

Ähnliche eindimensionale Interaktionen zwischen den α-Ketten wurden mit einer früher beschriebenen Methode (76) von Herrn H. Hofmann durchgeführt und erbrachten sehr ähnliche Ergebnisse.

Während man bei einer eindimensionalen Berechnung nur Aussagen über die axiale Zuordnung der tripelhelikalen Moleküle erhalten kann, sollte man aus einer dreidimensionalen Berechnung der Interaktion zwischen tripelhelikalen Molekülen, wie sie von Hofmann et.al. (76) für Typ I und III Kollagen durchgeführt worden ist, auch eine Aussage über die laterale und azimutale Lage der Moleküle zueinander erwarten. Dazu wird die Tripelhelix wie ein Zylinder mit einem Durchmesser von 1nm behandelt, aus dem die Seitenketten der Aminosäuren herausragen. Zwei solcher Zylinder werden axial aneinander vorbeigeschoben und gleichzeitig in ihrer azimutalen Lage gegeneinander verdreht. Den einzelnen Aminosäuren werden in Abhängigkeit von der Länge ihrer Seitenketten bestimmte Reaktionsräume gegeben. Kommt es zu einer Überlappung von zwei Reaktionsräumen, wird eine Interaktion angenommen. Nach bestimmten Bewertungssystemen werden Cluster von hydrophoben Aminosäuren oder auch geladener, polarer Aminosäuren erhöht bewertet. Die Berechnungen von Herrn Hofmann, in die auch noch die Reihenfolge der α-Ketten in der Tripelhelix, z.B. α1-α2-α1 eingehen, ergeben für die axiale Anordnung der 7s-Domänen die gleichen Ergebnisse wie die eindimensionale Anordnung der α1-Ketten. Die azimutale Anordnung ist abhängig von der Anordnung der α1-Ketten in der Tripelhelix,

sowie von der Ganghohe der Tripelhelix. Fur eine Kettenreihenfolge von α2-α1-α1 und einer Ganghohe von 30 Resten wurde fur antiparallel angeordnete Helizes eine relativ breite, selbstinteraggierende Reaktionskante von etwa Π/2 (bezogen auf die Grundflache des die Tripelhelix bildenden Zylinders) gefunden. Die Interaktion von zwei parallel angeordneten Tripelhelizes zeigt kein ausgesprochen hydrophobes Maximum und wird durch elektrostatische Abstoßung gestört.

Die dreidimensionale Auswertung der Sequenz der 7s-Domane laßt den Schluß zu, daß sich zunachst zwei Typ IV Kollagen Molekule mit ihren 7s-Domanen antiparallel zusammenlagern. Die Reaktionskante ist aber breit genug, sodaß eine Wechselwirkung mit einem zweiten dimeren Paar zu einer tetrameren Einheit möglich erscheint (s. Abb.61, S.129). Diese Berechnungen stimmen mit den Befunden uberein, daß in Uberstanden von Typ IV Kollagen synthetisierenden Zellen in Kultur nur Dimere gefunden wurden, in denen die Molekule mit ihren 7s-Domänen antiparallel angeordnet sind.

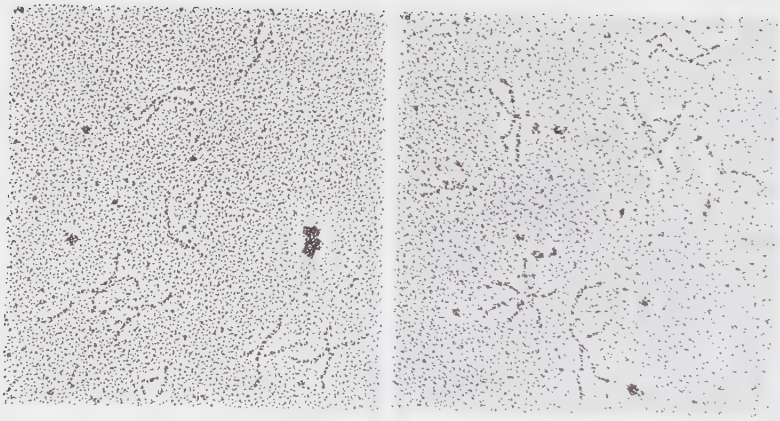
3.1.7. Reduktion von 7s lange Form in nativem Zustand

Nach den dreidimensionalen Berechnungen liegen die Tripelhelizes im tetrameren 7s-Kollagen in einer tetragonalen Anordnung so vor, daß die antiparallel orientierten Molekule intensiver miteinander interaggieren als parallel orientierte. Neben reduzierbaren Disulfid-

brucken konnen die Molekule auch durch von Lysin und Hydroxylysin abgeleiteten Quervernetzungen miteinander verknupft sein. In Analogie zu den fibrillenbildenden Kollagenen können die uberlappenden Moleküle nach Oxidation eines Lysin- bzw. eines Hydroxylysinrestes im nicht helikalen, N-terminalen Bereich grundsätzlich auf zwei verschiedene Weisen miteinander reagieren: erstens durch Bildung einer Schiff'schen Base zwischen dem nicht helikalen Allysin und dem Hydroxylysin im tripelhelikalen Quervernetzungsbereich, wodurch zwei antiparallel orientierte Moleküle fixiert werden; und zweitens durch eine Aldolkondensation zweier Allysine in den nicht helikalen Bereichen zweier parallel angeordneter Moleküle.
Es bestand die Frage, ob und in welchem Ausmaß beide Moglichkeiten realisiert werden. Dies wurde an der langen Form des 7s-Kollagens nach möglichst quantitativer Reduktion der Disulfidbrücken mit DDT unter nativen Bedingungen (45) im Elektronenmikroskop überprüft. In Abbildung 21A erkennt man neben unverändertem 7s-Kollagen am häufigsten zwei antiparallele Dimere (von 90nm Länge), die nur noch an einer Stelle miteinander verbunden sind. Ganz selten gibt es auch einzelne antiparallele Dimere.

Diese antiparallel orientierten Dimere sind durch Bindungen des Schiff'schen Base Typs miteinander verknüpft. Durch zusätzliche Aldolkondensation von Allysinen in den nicht helikalen Bereichen können die antiparallelen Dimere dann zu Tetrameren vernetzt werden, was im Elektronenmikroskop zu an einer Stelle oder an zwei Stellen (intaktes 7s) zusammenge-

(A)



(B)

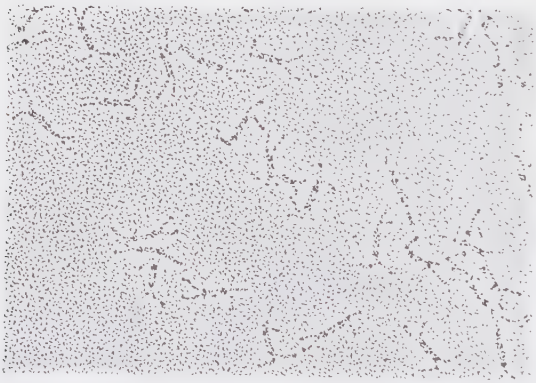


Abb.21 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von
(A) nativ reduziertem 7sL
(B) 7sL (Ausgangsmaterial für die native Reduktion).
Vergrößerung 1:150000.

haltenen Tetrameren fuhrt. Die Möglichkeiten zu solchen intermolekularen Bindungen uber die nicht helikalen Bereiche sind dagegen jedoch nicht voll ausgeschöpft. Die antiparallel orientierten Moleküle scheinen dagegen quantitativ uber Lysinreste verknupft zu sein, da man im Elektronenmikroskop keine 60nm langen monomeren 7sL-Domänen beobachten kann. Ebenso sind keine Dimere zu sehen, die nur über nicht helikale Bereiche zusammengehalten werden und die sich im Elektronenmikroskop als 120nm lange Fäden bemerkbar machen würden.

Über gleichzeitig vorliegende intramolekulare Bindungen an dieser Stelle kann durch diese Untersuchungen nichts ausgesagt werden.

3.2. NC1, globulare Quervernetzungsdomane des Typ IV Kollagens

Am C-Terminus besitzt Typ IV Kollagen einen nicht-kollagenen Bereich, die NC1-Domane. Sie stellt neben der 7S Domane die zweite Quervernetzungsdomane dar und verknupft zwei Typ IV Molekule durch kovalente Bindungen. Hierdurch und durch die 7S Domane wird der Aufbau der Raumnetzstruktur gewahrleistet. Um diese makromolekulare Organisation des Typ IV Kollagens verstehen zu können, war eine molekulare Charakterisierung der NC1-Domane notwendig. Hierzu mußte als erstes die NC1-Domane aus Gewebe isoliert werden. Die NC1-Domane ist Pepsin sensibel und wird daher bei der Isolierung von Typ IV Kollagen aus Plazenta zerstort. Da sie jedoch Kollagenase bestandig ist, kann sie durch Abbau der Tripelhelix mit Kollagenase hergestellt werden. Als Ausgangsmaterial diente menschliche Plazenta, welche in einer zweistufigen Methode zur NC1-Domane abgebaut wird.

3.2.1. Isolierung der NC1-Domane aus menschlicher Plazenta

In der ersten Stufe wurde durch milde Kollagenasebehandlung des Plazentagewebes (500IU/kg, 24h, 20°C) nur ein Teil der tripelhelikalen Domane zerstort, sodaß die nicht-kollagene, globulare Domane als dimeres Fragment noch mit 130-270nm langen, tripelhelikalen Bruchstucken behaftet in Losung ging oder mit Essigsaure aus dem Gewebe extrahiert werden konnte.

Da sich die NC1-Domane in dieser Form noch wie Kollagen verhalt, konnte sie durch die üblichen, für Typ IV Kollagen ausgearbeiteten Fällungsmethoden (113), von anderen nicht-kollagenen Proteinen, die ebenfalls durch Kollagenase nicht zerstört worden waren, abgetrennt werden. In der zweiten Stufe erfolgte dann eine nochmalige, intensive Kollagenasebehandlung (0.2IU/mg, 16h, 37°C), um die tripelhelikalen Anteile völlig zu entfernen.

Im Elektronenmikroskop erkennt man globuläre Einheiten (Abb.22). Sie stammen aus zwei ursprünglich miteinander verknupften Molekulen und enthalten daher 6 (2x3) NC1-α-Kettenfragmente (2x2 α1(IV)NC1 und 2x1 α2(IV)NC1)

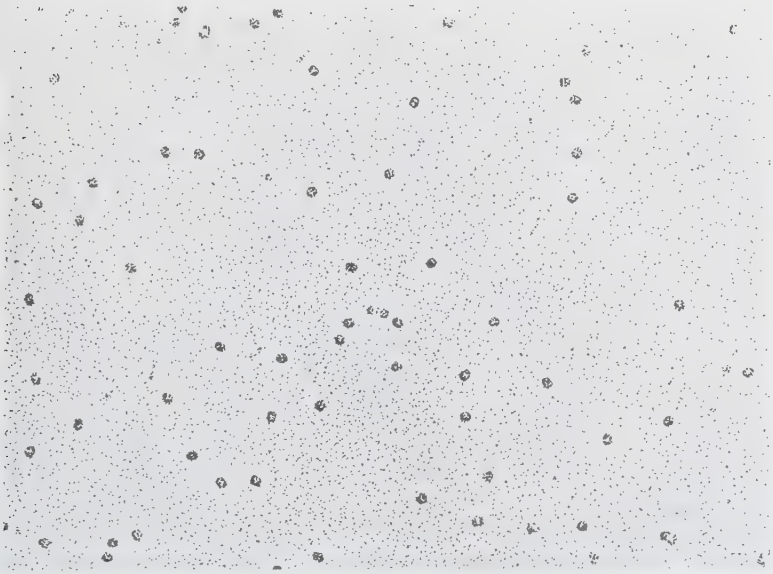


Abb.22 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der NC1-Domane des Typ IV Kollagens, isoliert durch zweistufigen Kollagenaseabbau aus menschlichem Plazentagewebe. Vergrößerung 1:150000.

3.2.2. Charakterisierung der hexameren NC1-Domane und Auftrennung in ihre Untereinheiten

Die Gelelektrophorese der hexameren NC1-Domane in Abbildung 23 zeigt monomere (M) und dimere (D) NC1-α-Kettenfragmente mit Molekulargewichten von 25kDa bzw. 50kDa. Vor Reduktion erscheinen beide als Doppelbanden. Der große Teil der Dimeren ist durch Disulfidbrucken verknupft und geht

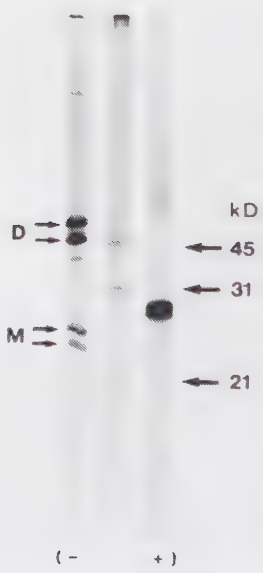


Abb.23 SDS-PAGE der hexameren NC1-Domäne vor und nach Reduktion.
von links: hexamere NC1-Domane, Molekulargewichtsstandard globulärer Proteine, reduzierte hexamere NC1-Domäne.
(+) reduziert, (-) nicht reduziert;

nach Reduktion in Monomere über. Nur etwa 5% der Dimere wird durch nicht reduzierbare, intermolekulare Quervernetzungen zusammengehalten. Durch die gleichzeitige Aufspaltung der intraketten Disulfidbrucken zeigten Dimere wie auch Monomere nach Reduktion eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit.

3.2.2.1. Isolierung und Charakterisierung der monomeren und dimeren NC1-α-Kettenfragmente

Da die gereinigte NC1-Domäne nach Lyophilisation nicht einmal mit 8M Harnstoff wieder vollständig in Lösung ging, wurde nach dem 2. Kollagenaseabbau gegen 0.1M Essigsäure dialysiert und anschließend an einem Rotationsverdampfer eingeengt. Dieses Konzentrat wurde direkt zur chromatographischen Trennung der monomeren und dimeren NC1-α-Kettenfragmenten verwendet. Am besten eignete sich hierfür Sephacryl S-300 als Säulenmaterial. Versuche mit 0.2M Bicarbonat, pH 8 und 0.1M Ammoniumformiat, pH 8.5 brachten keine befriedigenden Ergebnisse. Erst durch Senkung des pH-Wertes auf pH 3 war die Trennung mit 0.1M Ammoniumformiat zufriedenstellend (Abb.24).
Die Vollständigkeit der Trennung von Monomeren und Dimeren ließ sich durch Gelelektrophorese überprüfen (Abb.25, S.59). Zum Teil war die dimere Fraktion noch durch eine Spur Monomere und die monomere Fraktion durch etwas Dimere verunreinigt. In diesem Fall wurde an TSK 3000 Säulen in 4M Guanidinium Hydrochlorid, pH 3.5 rechromatographiert und

man erhielt dann reine Monomere und Dimere. Die Fraktionen der Monomeren (M) und Dimeren (D) entsprechen etwa den Molekulargewichten 30kDa bzw. 55kDa und ihr Massenverhaltnis schwankte je nach Aufarbeitung zwischen 1:1 und 1:1.3.
Nach Reduktion ging der große Teil der Dimeren in Monomere uber. Nur ein kleiner, durch nicht reduzierbare Quervernetzungen zusammengehaltener Teil wurde nicht gespalten.
Nach Sequenzierung und Vergleich der erhaltenen Doppelse-

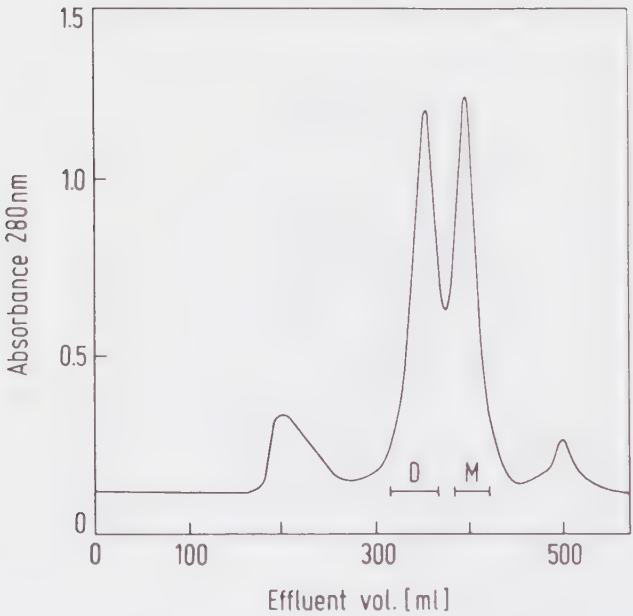


Abb.24 Profil der Chromatographie der hexameren NC1-Domane an einer Sephacryl S-300 Saule, equilibriert in 0.1M NH_4HCOO, pH 3.
M ≙ monomere NC1-α1-Kettenfragmente;
D = dimere NC1-α1-Kettenfragmente.

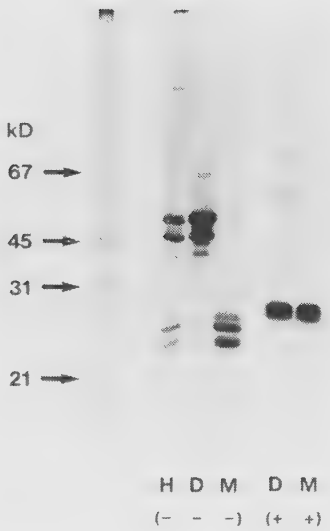


Abb.25 SDS-PAGE der hexameren NC1-Domäne (H), der Monomer (M) und Dimer (D) Fraktionen von Abb.24 vor und nach Reduktion.
reduziert (+), nicht reduziert (-);

quenzen mit den N-terminalen Sequenzen der α1- und α2-Kettenfragmente der NC1-Domäne aus Maus (47) (s. Abb.27, S.62), konnte gezeigt werden, daß die Monomer Fraktion α1- und α2-Ketten in einem Verhältnis von 1:1 und die Dimer Fraktion sie in einem Verhältnis von annähernd 6:1 enthielt.

3.2.2.2. Isolierung von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1 und deren Charakterisierung

Fur Untersuchungen der Primarstruktur war es wichtig, α1- und α2-Ketten der NC1-Domane voneinander zu trennen. Ausgangsmaterial hierfür stellte die nicht reduzierte Monomer Fraktion M aus Abb.24 dar, die in Abb.25 mit SDS-PAGE eine Doppelbande zeigt. Die Trennung mit reversed phase HPLC Saulen erwies sich als schwierig und gelang erst nach systematischer Untersuchung. Nach Variation des Saulenmaterials verschiedener Hersteller (C18, C2, Phenyl), der Temperatur (im Bereich von 25°-55°C), der Elutionspufferzusammensetzung (iso-Propanol, Acetonitril) und des Gradienten, konnte das beste Ergebnis mit einer Vydac C18 reversed phase HPLC Säule erzielt werden, die bei 40°C mit einem Gradienten von 17.5%-35% iso-Propanol in 0.1% TFA eluiert wurde. Unter diesen Bedingungen konnten die Monomere in vier Fraktionen (I-IV) aufgetrennt werden (Abb.26). Diese vier Fraktionen wurden durch Sequenzanalyse der N-terminalen Bereiche charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 wiedergegeben. Fraktionen II und III enthielten einheitliche Sequenzen, die mit Hilfe der Primarstruktur des Ubergangsbereiches der Tripelhelix in die NC1-Domane der α1(IV)- und α2(IV)-Ketten aus Maus (47) identifiziert werden konnten. Danach besteht Fraktion II aus der α1- und Fraktion III aus der α2-Kette der NC1-Domäne.

Fraktion I und IV zeigten zwei Sequenzen. Neben der α1- bzw. α2-Kette enthalten beide eine um 10 Aminosaurereste

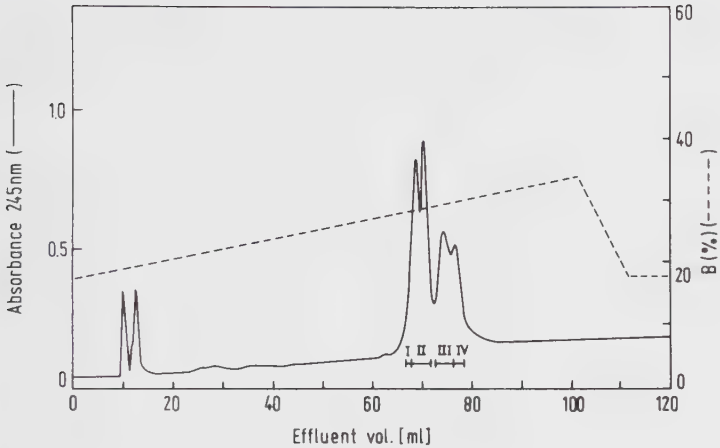


Abb.26 Profil der reversed phase HPLC Chromatographie der Fraktion M aus Abb.24.
Bedingungen: Vydac TP-RP18, C18 reversed phase HPLC Säule; linearer iso-Propanol/ 0.1%TFA Gradient, 40°.
Fraktion I = α1(IV)NC1 und ein um zehn Aminosäuren kürzeres α2(IV)NC1;
Fraktion II = α1(IV)NC1;
Fraktion III = α2(IV)NC1;
Fraktion IV = α2(IV)NC1 und ein um zehn Aminosäuren kürzeres α2(IV)NC1.

verkürzte Version der α2-Kette.

Die Trennung konnte mit Gelelektrophorese kontrolliert werden, wobei sich zeigte, daß die α1-Kette der oberen und die α2-Kette der unteren Bande der Monomeren entspricht.

Um einen möglichst großen Abschnitt der N-terminalen Sequenz der beiden Ketten zu erhalten, wurden 25nM der Fraktion II (saubere α1-Kette) und ebenso 25nM der Fraktion III (saubere α2-Kette) sequenziert. In Abbildung 38 (S.83) sind die für

```
Fraktion II  Gly Pro Hyp Gly Thr Pro Ser Val Asp His Gly Phe
P1CB7        Gly Pro Hyp Gly Thr Hyp Ser Val Asp His Gly Ser

Fraktion III Gly Met Hyp Gly Arg Ser Val Ser Ile Gly Tyr Leu
P2CB10a      ...(Met)Hyp Gly Arg(Ser)


Fraktion I  -Gly Pro Hyp Gly Thr Pro Ser Val Asp His Gly Phe
            -Tyr Leu Leu Val Lys His Ser Gln Thr Asp Gln Glu

Fraktion IV -Gly Met Hyp Gly Arg Ser Val Ser Ile Gly Tyr Leu
             Leu Val Lys His Ser Gln Thr Asp Gln Glu Pro Met
            -.......................................Tyr Leu
             Leu Val Lys His Ser Gln Thr Asp Gln Glu Pro Met
```

Abb.27 N-terminale Sequenzen der Fraktionen I-IV aus Abb.26 nach C18 reversed phase HPLC Trennung der NC1-Monomere (menschl.Plazenta) und Sequenzen der Fragmente P1 und P2 (Maus Tumor).
Fraktionen II, I = NC1-α1-Kette
Fraktionen III, IV = NC1-α2-Kette
Fraktionen I und IV enthalten zusatzlich eine um 10 Amonosäuren kürzere α2-Kette.
P1CB7 aus Schuppan et.al. (47)
P2CB10a aus Schuppan, D., Doktorarbeit, Uni München (1982)

die α1-Kette bestimmten 57 Schritte und in Abbildung 40 (S.85) die für die α2-Kette bestimmten 27 Schritte eingezeichnet. Ihre Aminosaurezusammensetzung und die des Hexameren sind in Tabelle 5 gezeigt. Fur weitere Arbeiten mit der α2-Kette konnten die Fraktionen III und IV vereinigt werden, sofern der intakte N-Terminus nicht benötigt wurde. Bei Arbeiten an der α1-Kette mußte auf Fraktion I verzichtet werden, weil diese mit α2-Ketten kontaminiert war.

	α1(IV)NC1	α2(IV)NC1	NC1
Hyp	0.3 (1)	- (1)	- (6)
Asp	15.2 (14)	17.5 (16)	95 (88)
Thr	15.2 (16)	10.1 (11)	81 (86)
Ser	26.8 (25)	24.5 (23)	155(146)
Glu	20.5 (19)	23.0 (21)	123(118)
Pro	17.0 (18)	12.8 (14)	88(100))
Gly	18.5 (19)	19.3 (20)	110(116)
Ala	15.3 (17)	15.1 (16)	91(100)
Val	11.0 (10)	11.2 (10)	66 (60)
Cys	7.2 (12)	6.9 (12)	51 (72)
Ile	10.5 (11)	10.0 (11)	61 (66)
Leu	15.3 (14)	21.0 (19)	99 (94)
Tyr	7.2 (9)	10.0 (12)	48 (60)
Phe	12.0 (11)	11.3 (10)	69 (64)
Hyl	0.8 (-)	1.3 (-)	2 (-)
His	6.2 (8)	5.9 (8)	35 (48)
Lys	6.4 (5)	9.1 (8)	42 (36)
Arg	12.0 (13)	9.5 (9)	74 (70)
Met	7.2 (9)	6.3 (8)	41 (52)

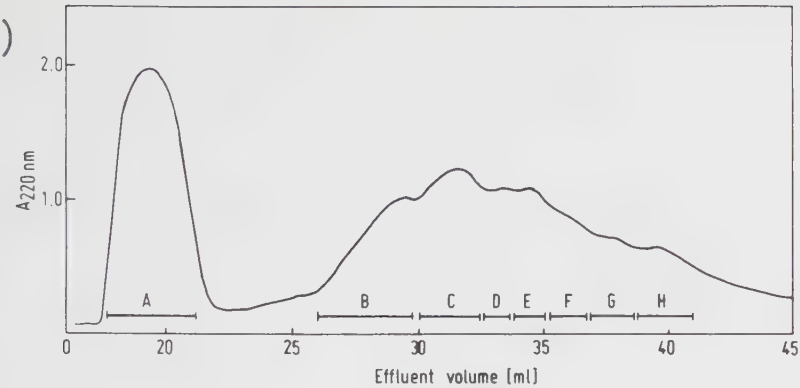
Tab.5 Aminosaurezusammensetzung der NC1-α1- und NC1-α2-Kette und der hexameren NC1-Domäne.
Zahlen in Klammern wurden aus der Sequenz berechnet.

3.2.3. Isolierung und Charakterisierung der BrCN-Peptide von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1

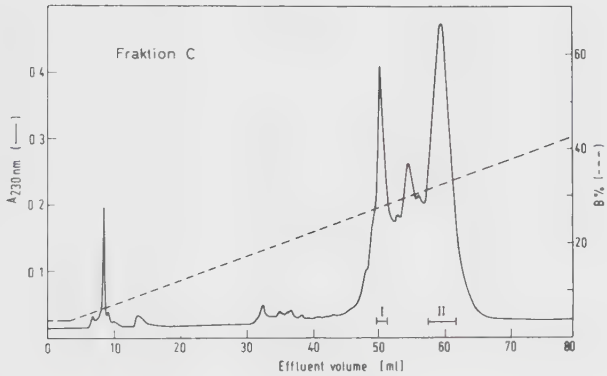
Die proteinchemische Bearbeitung der beiden NC1-α-Ketten erwies sich als äußerst schwierig. Die Ketten waren wie die Monomeren Fraktion in neutralen oder leicht alkalischen Lösungsmitteln nur wenig löslich. Zur Erreichung einer vollständigen Spaltung mit Proteasen oder auch mit BrCN wurde die Reduktion der Disulfidbrücken als notwendig

angesehen. Dies fuhrte jedoch zur volligen Unloslichkeit in den ublichen neutralen Losungsmitteln. So war das Material z.B. nach Reduktion mit Merkaptoethanol in Bikarbonat, pH 7, mit anschließender Alkylierung in 8M Harnstoff nicht mehr loslich. Gut loslich war sowohl das reduzierte als auch das nicht reduzierte Material nur bei niedrigen pH-Werten. So mußte die fur eine vollstandige BrCN-Spaltung notwendige Reduktion der Methioninsulfoxide in 5%iger Essigsaure bei pH 2.5 mit Merkaptoessigsäure und die Spaltung der Disulfidbrücken mit β-Merkaptoethanol in 8M Harnstoff durchgeführt werden. Zunachst wurden die freien SH-Gruppen mit Aziridin alkyliert. Die anschließende Spaltung mit BrCN in 70%iger Ameisensäure ergab jedoch ein Peptidgemisch, das jedoch weder durch HPLC-Gelfiltration (TSK 2000, TSK 3000, Kieselgel) in verschiedenen Elutionspuffern (NH_4OAc, $(NH_4)_2SO_4$, TFA, Guanidinhydrochlorid, HOAc, HCOOH, iso-Propanol), noch an reversed phase HPLC Saulen (C18, C4, Phenyl) unter Verwendung verschiedener Eluenten (iso-Propanol, Acetonitril, TFA, HCOOH) getrennt werden konnte.
Schließlich wurde durch Änderung des Alkylierungsreagenzes versucht, den Ketten eine etwas veranderte Polaritat zu geben und so eine Trennung der BrCN-Peptide zu ermoglichen. Die in 6M Guanidinium Hydrochlorid mit DTT reduzierten und mit JAcONa alkylierten α-Ketten wurden ebenfalls in 70%iger Ameisensäure mit BrCN unter N_2 gespalten. Abbildung 28A zeigt die Chromatographie der so behandelten NC1-α1-Kette an TSK 3000 HPLC-Gelfiltrationsäulen in 0.05% TFA. Die Trennung der BrCN-Peptide ist immer noch unbefriedigend, stellt aber

(A)


2.0
1.0
$A_{220\,nm}$
A
B
C
D
E
F
G
H
0
20
25
30
35
40
45
Effluent volume [ml]

(B)


Fraktion C
0.4
0.3
0.2
0.1
$A_{230\,nm}$ (——)
60
40
20
B % (- - - -)
I
II
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Effluent volume [ml]

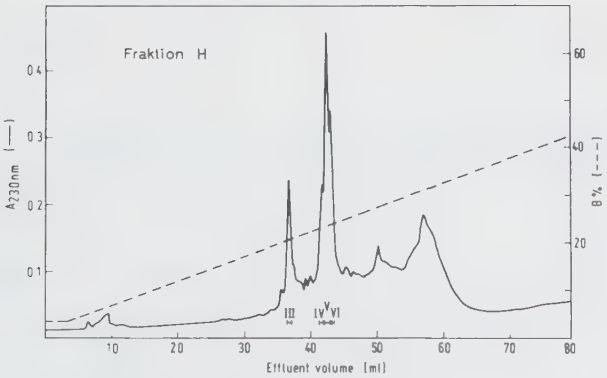

Fraktion H
0.4
0.3
0.2
0.1
$A_{230\,nm}$ (——)
60
40
20
B % (- - - -)
III
IV
V
VI
10
20
30
40
50
60
70
80
Effluent volume [ml]

Abb.28 (vorige Seite)
(A) Chromatographie eines durch BrCN-Spaltung der reduzierten und carboxymethylierten NC1-α1-Kette erhaltenen Peptidgemisches an zwei TSK 3000 Gelfiltrationssaulen equilibriert in 0.05% TFA. Fraktionen siehe Text.

(B) Rechromatographie der Fraktionen C und H an einer Vydac C18 reversed phase HPLC Saule. Bedingungen siehe Abb.9B, S.27.
I, II, III = α1(IV)NC1 CB1
IV, V, VI = α1(IV)NC1 CB3

	CB1	CB3	CB4	Frakt.A
Hyp	0.8 (1)	-	-	-
Asp	5.8 (5)	1.7 (1)	0.2 (0)	10.1 (9)
Thr	5.2 (6)	0.7 (1)	0.6 (1)	9.0 (10)
Ser	5.4 (6)	0.6 (1)	4.1 (5)	17.2 (19)
Glu	5.5 (5)	2.0 (2)	2.2 (2)	15.0 (14)
Pro	4.8 (4)	3.1 (3)	3.0 (3)	14.8 (14)
Gly	9.6 (9)	1.6 (1)	2.1 (2)	10.9 (10)
Ala	2.3 (2)	4.6 (4)	1.1 (1)	16.0 (15)
Val	3.0 (3)	0.9 (1)	1.9 (2)	6.5 (7)
CMC	1.2 (2)	1.1 (2)	0.6 (1)	7.8 (10)
Hse(Met)	0.6 (1)	0.6 (1)	0.7 (1)	6.3 (8)
Ile	2.3 (2)	3.1 (3)	3.3 (3)	9.1 (9)
Leu	5.5 (6)	0.1 (-)	0.8 (1)	8.6 (8)
Tyr	2.6 (3)	- (-)	0.7 (1)	5.1 (6)
Phe	2.2 (2)	1.3 (1)	1.1 (1)	8.8 (9)
Hyl	0.4 (-)	0.2 (-)	0.4 (-)	0.6 (-)
His	3.3 (4)	- (-)	0.6 (1)	2.9 (4)
Lys	2.4 (2)	0.3 (-)	0.2 (-)	3.5 (3)
Arg	2.9 (3)	2.1 (2)	- (-)	9.0 (10)

Tab.6 Aminosaure Zusammensetzungen der Peptide CB1, CB3, CB4 und der Fraktion A nach BrCN-Spaltung von α1(IV)NC1. Zahlen in Klammern wurden aus der Sequenz berechnet.

das Beste dar, was mit diesem Material erzielt werden konnte.

Zur weiteren Reinigung wurden die Fraktionen A-H mit einer C18 reversed phase HPLC Saule nachgereinigt und die dabei auftretenden Hauptgipfel durch N-terminale Sequenzanalyse und Aminosaurezusammensetzungen weiter charakteisiert (Tab.6). Als Beispiel sind in Abb.28B die Rechromatographien der Fraktionen C und H dargestellt. Es wurden sechs Fraktionen geschnitten, von denen die Fraktionen I, II und III CB1 und die Fraktionen IV, V und VI CB3 enthielten. Da bei der Nachreinigung der Fraktionen D, E, F und G in allen Fällen ungefahr das gleiche Profil wie bei der Fraktion H erhalten wurde, konnte auf eine weitergehende Charakterisierung verzichtet werden. Fraktion A der Abb.28A ergab bei der Nachreinigung einen breiten Peak, der nur die verkürzte α1-Kette, beginnend mit dem N-Terminus von CB2, enthielt. Fraktion B beinhaltete ein Gemisch aus CB1, CB3 und CB4.

Die noch fehlenden BrCN-Peptide CB5 und CB6 wurden erst bei der Suche nach disulfidquervernetzten Peptiden der monomeren α1-Ketten der NC1-Domäne gefunden (Kap. 3.2.9.2.). Sie sind der Vollständigkeit halber in Abbildung 29 in der Liste der Sequenzen der BrCN-Peptide der α1-Kette mitaufgeführt.

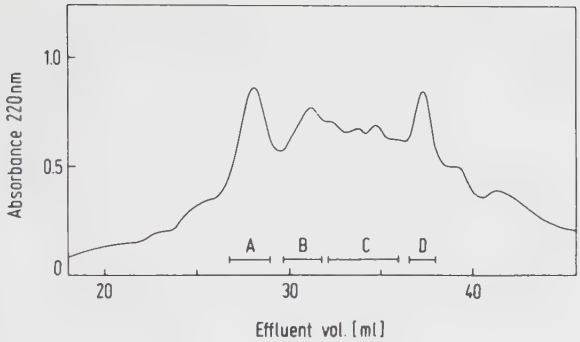
Trotz gleicher Behandlung war die Trennung des BrCN-Peptidgemisches der NC1-α2-Kette etwas übersichtlicher (Abb.30A). Es wurden die Fraktionen A, B, C und D der gleichen Nachreinigung unterzogen, wie für die α1-Kette beschrieben. Als Beispiel sind in Abb.30B die Profile der Fraktionen A

```
      1                 5                   10
CB1   Gly Pro Hyp Gly Thr Pro Ser Val Asp His Gly Phe Leu Val
      15                20                  25
      Thr Arg His Ser Gln Thr Ile Asp Asp Pro Gln Cys Pro Ser
      30
      Gly Thr Lys

      67            70                  75                  80
CB2   Pro Phe Leu Phe Cys Asn Ile Asn Asn Val Cys Asn Phe Ala
                    85
      Ser Arg Asn Asp Tyr

      100                 105                 110
CB3   Ala Pro Ile Thr Gly Glu Asn Ile Arg Pro Phe Ile Ser Arg
          115                 120
      Cys Ala Val Cys Glu Ala Pro Ala Met Val

      125                 130                 135
CB4   Ala Val His Ser Gln Thr Ile Gln Ile Pro Pro

      152                             160
CB5   His Thr Ser Ala Gly Ala Glu Gly Ser Gly Gln

      208                         215
CB6   Phe Lys Lys Pro Thr Pro Ser Thr Leu Lys Ala
```

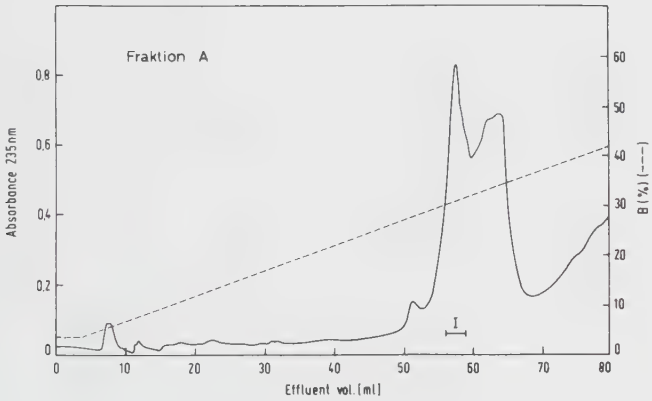
Abb.29 N-terminale Sequenzen der BrCN-Peptide CB1-CB6 von α1(IV)NC1.

und D dargestellt. Bei der Sequenzanalyse wurde in Fraktion I CB6, in Fraktion II CB1 und in Fraktion III CB3 sowie das Doppelpeptid CB2-3 gefunden. Fraktion C wurde in der gezeigten Breite geschnitten, da die einzelnen Spitzen dieses Gebirges bei Analyse mit reversed phase HPLC annahernd das gleiche Profil zeigten. Sie enthielten die BrCN-Peptide CB3, CB4 und CB5. Fraktion B ergab nach Nachreinigung nur einen Peak, welcher CB5

(A)


Absorbance 220nm
1.0
0.5
0
A
B
C
D
20
30
40
Effluent vol. [ml]

(B)


Fraktion A
Absorbance 235nm
0.8
0.6
0.4
0.2
0
B (%) (---)
60
50
40
30
20
10
0
I
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Effluent vol. [ml]

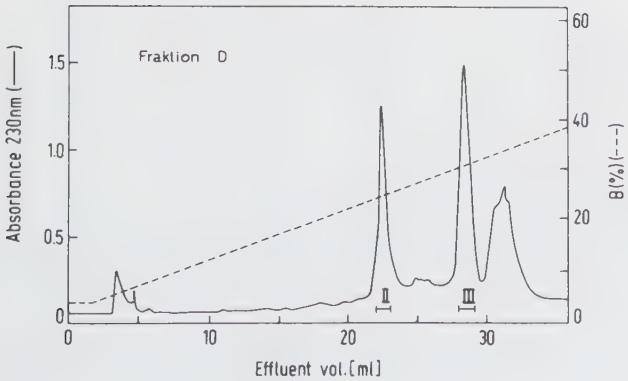

Fraktion D
Absorbance 230nm (——)
1.5
1.0
0.5
0
B (%) (---)
60
40
20
0
II
III
0
10
20
30
Effluent vol. [ml]

Abb.30 (vorige Seite)
(A) Chromatographie eines durch BrCN-Spaltung der reduzierten und carboxymethylierten NC1-α2-Kette erhaltenen Peptidgemisches an zwei TSK 3000 Gelfiltrationssaulen, equilibriert in 0.05% TFA. Fraktionen siehe Text.

(B) Rechromatographie der Fraktionen A und D an einer Vydac C18 reversed phase HPLC Saule. Bedingungen siehe Abb.9B, S.27.
I = α2(IV)NC1 CB6
II = α2(IV)NC1 CB1
III= α2(IV)NC1 CB3, CB2-3

	CB1	CB2-CB3	CB4	CB5	CB6
Hyp	0.8(1)	-	-	-	-
Asp	1.0(1)	3.1(3)	4.0(4)	2.0(2)	5.4(5)
Thr	1.0(1)	1.3(1)	2.3(2)	0.3(-)	6.5(7)
Ser	2.8(3)	4.4(4)	3.0(3)	5.0(5)	7.7(8)
Glu	3.0(3)	4.2(4)	0.4(-)	5.5(5)	8.5(9)
Pro	0.8(1)	0.8(1)	3.7(4)	3.7(4)	4.0(4)
Gly	2.4(2)	4.8(5)	1.2(1)	2.4(2)	9.4(9)
Ala	0.2(-)	3.2(3)	1.7(2)	5.5(6)	5.3(5)
Val	2.1(2)	0.8(1)	1.0(1)	4.0(4)	2.3(2)
CMC	0.2(-)	1.7(2)	2.1(2)	3.2(3)	4.6(5)
Hse	0.4(1)	0.7(1)	0.5(1)	0.5(1)	0.5(1)
Ile	1.2(1)	0.4(-)	- (-)	5.5(6)	4.3(4)
Leu	2.1(2)	5.7(6)	2.7(3)	1.5(2)	5.2(5)
Tyr	0.8(1)	2.1(2)	3.9(4)	1.6(2)	3.0(3)
Phe	- (-)	1.9(2)	1.0(1)	2.0(2)	4.8(5)
Hyl	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
His	1.3(1)	1.3(1)	- (-)	2.4(2)	4.0(4)
Lys	0.8(1)	1.8(2)	0.7(1)	0.6(1)	1.8(2)
Arg	0.8(1)	1.0(1)	1.1(1)	2.1(2)	4.0(4)
Met	- (-)	0.7(1)	- (-)	- (-)	- (-)

Tab.7 Aminosaure Zusammensetzungen der Peptide CB1, CB2-3, CB4, CB5 und CB6 von α2(IV)NC1.
Zahlen in Klammern wurden aus der Sequenz berechnet.

beinhaltete. Die N-terminalen Sequenzen der BrCN-Peptide der α2-Kette sind in Abb.31, die Aminosaurezusammensetzungen in Tab.7. aufgelistet.

Das Verschmieren der BrCN-Peptide beider Ketten über den gesamten Elutionsbereich, führte zu unbefriedigenden

```
      3                                10                  15
CB1   Hyp Gly Arg Ser Val Ser Ile Gly Tyr Leu Leu Val Lys His
                  20
      Ser Gln Thr Asp Gln


      25
CB2   Cys Pro Val Gly Met


      30                  35                  40
CB3   Asn Lys Leu Trp Ser Gly Tyr Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Gly
          45                  50                  55
      Gln Glu Lys Ala His Asn Gln Asp Leu Gly Leu Ala Gly Ser


      66              70                  75
CB4   Pro Phe Leu Tyr Cys Asn Pro Gly Asp Val Cys Tyr Tyr Ala
      80
      Ser Arg Asn Asp Lys


      98                          105                 110
CB5   Pro Val Ala Glu Asp Glu Ile Lys Pro Tyr Ile Ser Arg Cys
                  115                 120                 125
      Ser Val Cys Glu Ala Pro Ala Ile Ala Ile Ala Val His Ser
                      130                 135
      Gln Asp Val Phe Ile Pro His Cys Gln Ala


      149                     155                 160
CB6   His Thr Ala Ala Gly Asp Glu Gly Gly Gly Gln Ser Leu Val
              165                 170                 175
      Ser Pro Gly Ser Cys Leu Glu Asp Phe Arg Ala Thr Pro Phe
                  180                 185                 190
      Ile Glu Cys Asn Gly Gly Arg His Thr Cys His Tyr Tyr Ala

      Asn
```

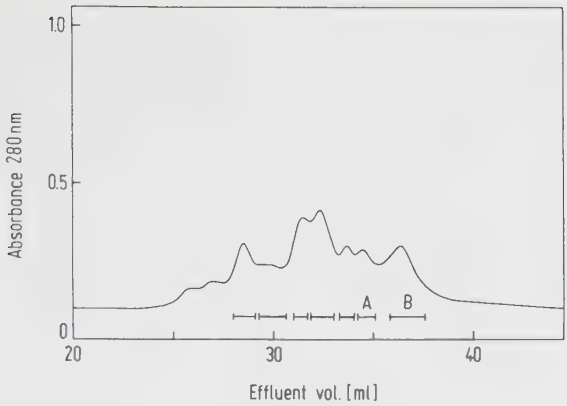
Abb.31 N-terminale Sequenzen der BrCN-Peptide von α2(IV)NC1

Trennungen. Es kann mit einer erhohten Tendenz der BrCN-Peptide zur Aggregation miteinander oder mit dem Säulenmaterial erklart werden, was jedoch in den meisten Fallen durch eine ausreichende Trennung an reversed phase HPLC Saulen ausgeglichen werden konnte.

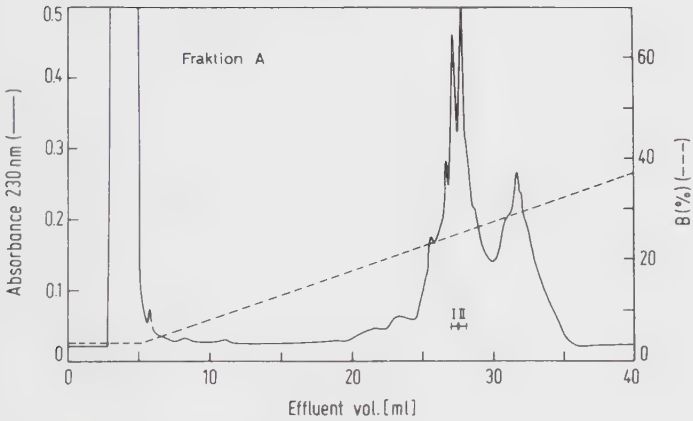
3.2.4. Isolierung und Charakterisierung der o-JBS-Peptide von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1

Durch Sequenzierung der intakten Ketten und der BrCN-Peptide wurden fur die NC1-α1- und die NC1-α2-Kette insgesamt 135 bzw. 157 Aminosaurepositionen bestimmt. Mit einer weiteren Spaltung der Ketten sollten überlappungspeptide und die Lücken abdeckende Peptide gefunden werden, um die Reihenfolge der BrCN-Peptide festlegen zu können.
Die bisher bekannten Sequenzen der beiden Ketten beinhalteten nur ein Tryptophan. Eine Spaltung an dieser scheinbar nicht häufig auftretenden Aminosaure mit ortho-Jodosobenzoesäure (o-JBS) sollte daher große Kettenbruchstucke ergeben. Hierzu wurden die beiden α-Ketten mit DTT reduziert, mit JAcONa carboxymethyliert (wie in Kap. 3.2.3. beschrieben) und anschließend nach Dialyse und Einengen in 80% Essigsaure und 4M Guanidinium Hydrochlorid mit o-JBS (1:1.2) bei Raumtemperatur für 40h im Dunkeln inkubiert. Die chromatographische Trennung des so aus α1(IV)NC1 erhaltenen Peptidgemisches an TSK 2000 Säulen, welche wegen den mit der BrCN-Peptid-Trennung gemachten

(A)


1.0
0.5
0
Absorbance 280 nm
A
B
20
30
40
Effluent vol. [ml]

(B)


Fraktion A
Absorbance 230 nm (——)
B (%) (- - -)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
60
40
20
0
I II
0
10
20
30
40
Effluent vol. [ml]

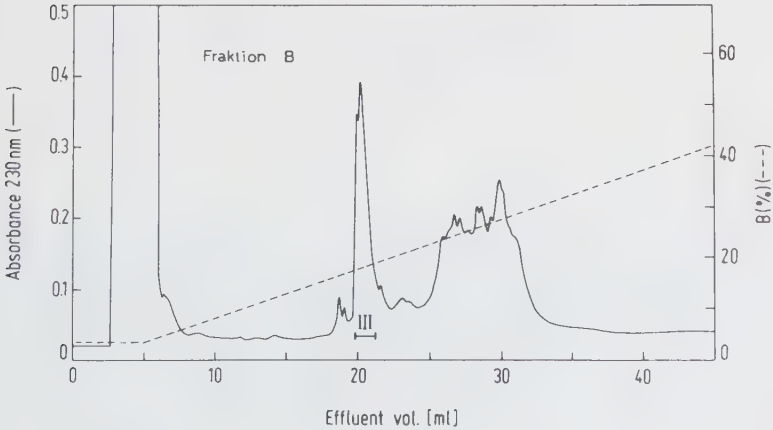

Fraktion B
Absorbance 230 nm (——)
B (%) (- - -)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
60
40
20
0
III
0
10
20
30
40
Effluent vol. [ml]

Abb.32 (vorige Seite)
(A) Chromatographie eines durch o-Jodosobenzoesäure-Spaltung der reduzierten und carboxymethylierten NC1-α1-Kette erhaltenen Peptidgemisches an zwei TSK 2000 Gelfiltrationssaulen, equilibriert in 4M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3.5.
(B) Rechromatographie der Fraktionen A und B an einer Vydac C18 reversed phase HPLC Säule. Bedingungen siehe Abb.9B, S.27.
I = α1(IV)NC1 o-JBS1, o-JBS2
II = α1(IV)NC1 o-JBS1
III = α1(IV)NC1 o-JBS5

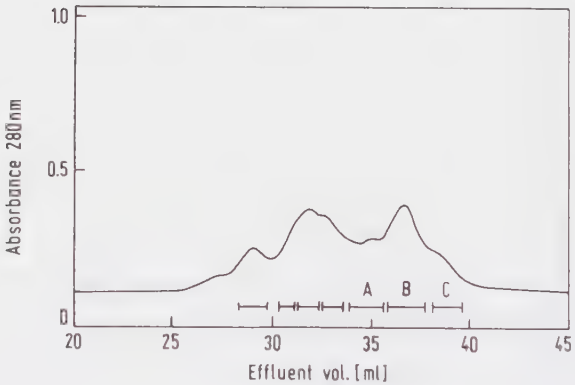
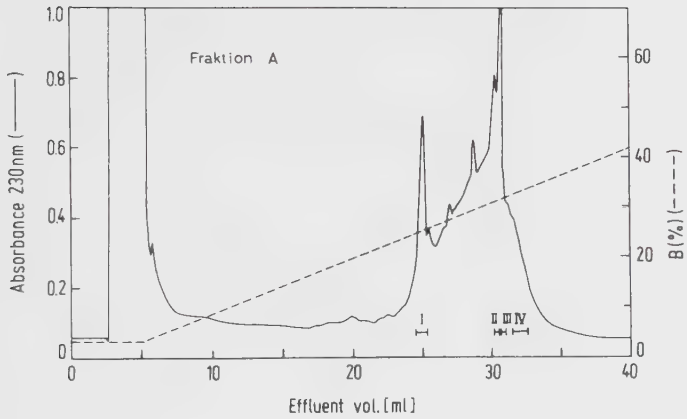


Abb.33 (A) Chromatographie eines durch o-Jodosobenzoesaure-Spaltung der reduzierten und carboxymethylierten NC1-α2-Kette erhaltenen Peptidgemisches an zwei TSK 2000 Gelfiltrationssäulen, equilibriert in 4M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3.5.



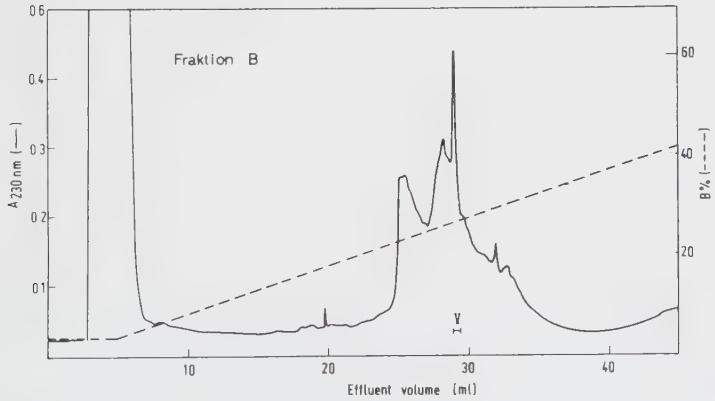


Abb.33 (B) Rechromatographie der Fraktionen A und B an einer Vydac C18 reversed phase HPLC Säule. Bedingungen siehe Abb.9B, S.27.
I = α2(IV)NC1 o-JBS6
II = α2(IV)NC1 o-JBS5
III = α2(IV)NC1 o-JBS2
IV = α2(IV)NC1 o-JBS2, o-JBS5, o-JBS4-5
V = α2(IV)NC1 o-JBS1, o-JBS2

Erfahrungen in 4M Guanidinium Hydrochlorid, pH 3.5 durchgefuhrt wurde, ist in Abbildung 32A gezeigt. Von den Fraktionen mit einem Elutionsvolumen kleiner als 34ml und einem Molekulargewicht von 13kDa-25kDa wurde angenommen, daß sie teilweise ungespaltenes Material enthalten. Sie wurden deshalb nicht weiter charakterisiert.

Die mit A und B bezeichneten Fraktionen wurden durch reversed phase HPLC Chromatographie weiter gereinigt (Abb.32B), wobei die Fraktionen I, II und III die Peptide o-JBS1 und o-JBS2 (I), o-JBS1 (II) und o-JBS5 (III) ergaben. Auf gleiche Weise wurde bei α2(IV)NC1 vorgegangen. Abbildung 33A zeigt die Molekularsiebchromatographie, welche drei weiter verarbeitbare Fraktionen A, B und C ergab. Ihre Nachreinigung an reversed phase HPLC Saulen in Abbildung 33B ergab folgende Peptide: o-JBS6 (I), o-JBS5 (II), o-JBS2 (III), o-JBS2, o-JBS5 und o-JBS4-5 (IV), o-JBS1 und o-JBS2 (V) und o-JBS3 (VI) (nicht abgebildet). In Abbildung 34 sind die durch Sequenzanalyse bestimmten Sequenzen der o-JBS-Peptide gezeigt. Bei der α1-Kette wurden die Peptide o-JBS3 und o-JBS4 nicht gefunden. Das vier Aminosauren lange Peptid o-JBS3 koeluierte sicherlich mit der Salzfraktion der Gelfiltrationssaulen und wurde deshalb nicht entdeckt. O-JBS4 war wahrscheinlich in einem Peak mit breitem Profil, der nicht weiter untersucht wurde, enthalten.

Die aus der o-JBS Spaltung erhaltenen Peptide erbrachten zwar keine Überlappung zweier BrCN-Peptide, jedoch 31 (α1(IV)NC1) bzw. 45 (α2(IV)NC1) neue Aminosaurepositionen.

(A)

```
          1                 5                   10
o-JBS1   Gly Pro Hyp Gly Thr Pro Ser Val Asp His Gly Phe Leu
              15                  20
         Val Thr Arg His Ser Gln Thr Ile Asp


         89                      95
o-JBS2   Leu Ser Thr Pro Glu Pro Met Pro Met Ser


         199                     205                 210
o-JBS5   Leu Ala Thr Ile Glu Arg Ser Glu Met Phe Lys Lys Pro
                      215                 220
         Thr Pro Ser Thr Leu Lys Ala Gly Glu Leu Arg Thr His
         225                 230
         Val Ser Arg Cys Gln Val Cys Met Arg
```

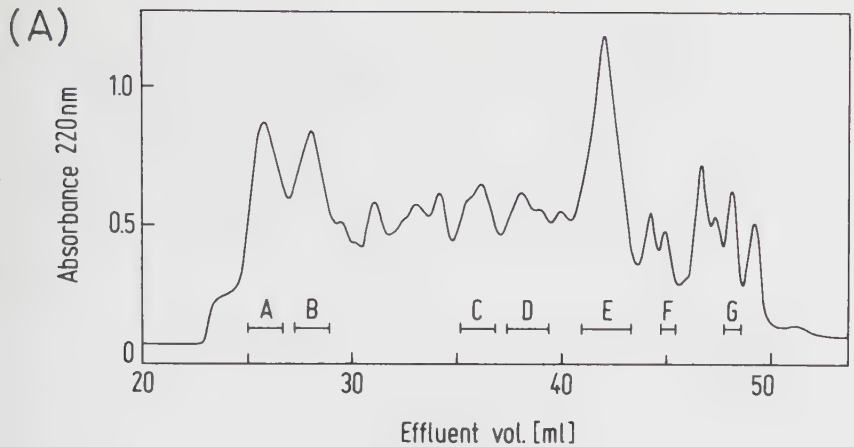
(B)

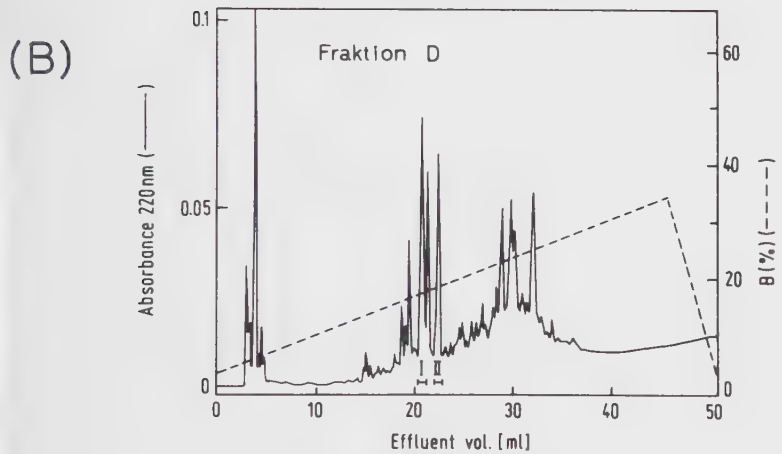
```
          1                 5                   10
o-JBS1   Gly Met Hyp Gly Arg Ser Val Ser Ile Gly


         34                      40
o-JBS2   Ser Gly Tyr Ser Leu Leu Tyr Phe Glu Gly Gln


         88                          95
o-JBS3   Leu Ser Thr Thr Ala Pro Leu Pro Met


         138
o-JBS4   Arg Ser Leu Trp


         142                             150
o-JBS5   Ile Gly Tyr Ser Phe Leu Met His Thr Ala


         197                             205
o-JBS6   Leu Thr Thr Ile Pro Glu Gln Ser Phe Gln Gly Ser Pro
         210                 215                 220
         Ser Ala Asp Thr Leu Lys Ala Gly Leu Ile Arg Thr His
```

Abb.34 N-terminale Sequenzen der o-JBS-Peptide o-JBS1, o-JBS2 und o-JBS5 von α1(IV)NC1 (A) und o-JBS1 - o-JBS6 von α2(IV)NC1 (B).

3.2.5. Isolierung und Charakterisierung der tryptischen Peptide von α2(IV)NC1

Die tryptische Spaltung wurde nur an der NC1-α2-Kette durchgeführt. Sie sollte dazu dienen, die BrCN- und die o-JBS-Peptide aneinanderzureihen und noch vorhandene Lücken zu schließen. Da die Trennungen von Peptidgemischen von reduziertem Material meist erhebliche Schwierigkeiten mit sich brachten, wurde für die tryptische Spaltung nicht-reduziertes Material verwendet. Die in schwach alkalischen Lösungsmitteln schlecht löslichen Ketten wurden in 2M Harnstoff, 0.2M Ammoniumbikarbonat mit 10% Trypsin (w/w) bei 37°C für 16h gespalten. Nach Ansäuern, Dialyse und Lyophilisation wurde das Peptidgemisch mit TSK 3000 Säulen in 0.05% TFA chromatographiert. Das Chromatogramm in Abbildung 35A konnte in zwei Teilbereiche aufgeteilt werden. Die Fraktionen A-C enthielten über Disulfidbrücken quervernetzte Peptide, welche auch nach Rechromatographie an reversed phase HPLC Säulen mehrdeutige Sequenzen lieferten und zu diesem Zeitpunkt noch nicht zugeordnet werden konnten. Erst im weiteren Verlauf der Arbeit, nach Kenntnis der gesamten Primärstruktur, konnten sie aber eindeutig einzelnen Peptiden zugeordnet werden. So enthielt Fraktion A eine mit T2 beginnende α2-Kette und Fraktion B die miteinander durch Disulfidbrücken vernetzten Peptide T3, T5, T10, T16 und Cht. Cht ist ein Peptid, welches durch chymotryptische Aktivität des Trypsin-Präparates entstand. In den Fraktionen D-G waren einzelne Peptide enthalten,


(A)
Absorbance 220nm
1.0
0.5
0
A
B
C
D
E
F
G
20
30
40
50
Effluent vol. [ml]


(B)
Fraktion D
Absorbance 220nm (——)
B(%) (- - - -)
0.1
0.05
0
60
40
20
0
I
II
0
10
20
30
40
50
Effluent vol. [ml]

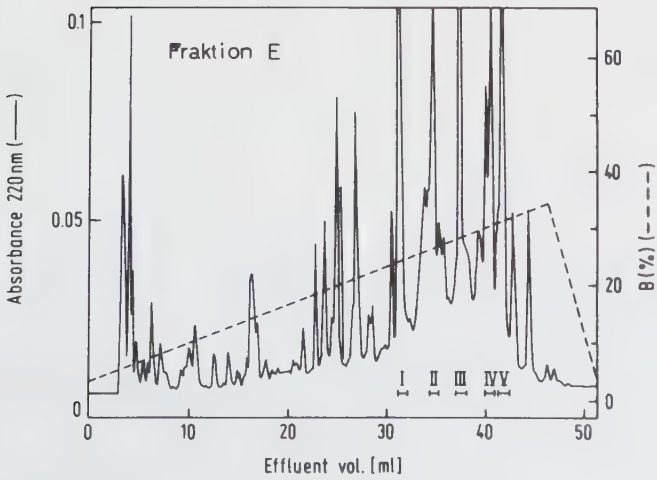

Fraktion E
Absorbance 220nm (——)
B(%) (- - - -)
0.1
0.05
0
60
40
20
0
I
II
III
IV
V
0
10
20
30
40
50
Effluent vol. [ml]

Abb.35 (vorige Seite)
(A) Chromatographie eines durch Trypsinspaltung von α2(IV)NC1 erhaltenen Peptidgemisches an zwei TSK 3000 Gelfiltrationssaulen equilibriert in 0.05% TFA. Fraktionen A-G wurden nachgereinigt. Fraktionen A-C enthalten quervernetzte oder unvollstandig gespaltene Peptide; Fraktionen D-G enthalten einzelne Peptide.
A enthalt T2-3; B enthalt T3,T5,T10,T16,Cht;
C enthalt T11,T12; D enthalt T11; E enthalt T8,T13;
F enthält T2; G enthält T4;

(B) Profil der Rechromatographie von Fraktion D und E an Vydac C18 reversed phase HPLC Saule.
Bedingungen wie in Abb.9B, S.27.
Fraktion D: I = α2(IV)NC1 T11
II = α2(IV)NC1 T4
Fraktion E: I-IV = α2(IV)NC1 T8
V = α2(IV)NC1 T13

deren Rechromatographie in Abbildung 35B beispielhaft an Fraktion D und E gezeigt ist. Wegen der geringen Mengen an Material wurden nur die Hauptfraktionen sequenziert, und es fanden sich folgende reine Peptide: T11 (I,D), T4 (II,D), T8 (I-IV,E), T13 (V,E). Abbildung 36 stellt samtliche sequenzierten, tryptischen Peptide dar, die 40 neue Aminosaure-Positionen erbrachten.

```
      6                10                  15
T2-3  Ser Val Ser Ile Gly Tyr Leu Leu Val Lys His Ser Gln Thr
      20
      Asp Gln Glu Pro Met

      16               20
T3    His Ser Gln Thr Asp Gln Glu Pro Met

      32
T4    Leu Trp Ser Gly Tyr Ser

      47
T5    Ala His Asn Gln Asp Leu Gly Leu

      85                   90                  95
T8    Ser Tyr Trp Leu Ser Thr Thr Ala Pro Leu Pro Met Met Pro
          100                  105
      Val Ala Glu Asp Glu Ile Lys

      111              115                 120
T10   Cys Ser Val Cys Glu Ala Pro Ala Ile Ala Ile Ala Val His
      125
      Ser Gln Asp Val

      173                          180
T11   Ala Thr Pro Phe Ile Glu Cys Asn Gly

      184                      190
T12   His Thr Cys His Tyr Tyr Phe Asn Glu

      193                          200                 205
T13   Tyr Ser Phe Trp Leu Thr Thr Ile Pro Glu Gln Ser Phe Gln

      Gly Ser Pro

      226
T16   Cys Gln Val Cys

      145                  150                 155
Cht   Tyr Ser Phe Val Met His Thr Ser Ala Gly Ala Glu Gly Ser
          160
      Gly Gln Ala Leu Ala Ser
```

Abb.36 N-terminale Sequenzen der isolierten tryptischen Peptide von α2(IV)NC1.
Cht = durch chymotryptische Aktivität entstandenes Peptid.
T3, T5, T10, T16 und Cht konnten erst nach Kenntnis der gesamten Primarstruktur durch cDNA-Sequenzen zugeordnet werden.

3.2.6. Anordnung der Peptide von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1

Die Untersuchung der durch BrCN, o-JBS und Trypsin Behandlung erhaltenen Peptide fuhrte weder bei der α1- noch bei der α2-Kette der NC1-Domane zur vollstandigen Aufklarung der Sequenz. So wurden bei α1(IV)NC1 179 von 235 und bei α2(IV)NC2 217 von 233 Aminosauren bestimmt. Eine weitere peptidchemische Untersuchung erubrigte sich aber, weil unterdessen in unserer Abteilung mit Hilfe von cDNA-Sequenzen aus Maustumorzellen die NC1-α1-Kette vervollstandigt

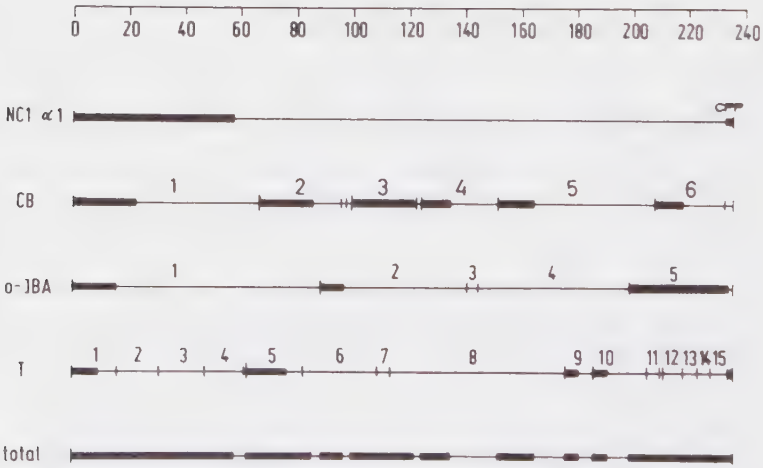


Abb.37 Schematische Darstellung der Positionen der mit BrCN (CB), o-JBS (o-JBS) und Trypsin (T) hergestellten Peptide von α1(IV)NC1; die Positionen konnten durch die cDNA-Sequenz von Maustumorzellen festgelegt werden (83).

```
        +          10                  20                  30                  40                  50
      G P P G T P S V D H G F L V T R H S Q T I D D P Q C P S G T K I L Y H G Y S L L Y V Q G N E R A H G
CHAIN -------------------------------------------------------------------------------------------------
  CB1 -----------------------
o-JBS1 ---------------
   T1 ---------

                         60                  70                  80                  90                 100
      Q D L G T A G S C L R K F S T M P F L F C N I N N V C N F A S R N D Y S Y M L S T P E P M P M S M A
CHAIN -------
                                CB2 --------------------                                          CB3 -
                                                                                  o-JBS2 --------
                          T5 ---------------

                        110                 120                 130                 140                 150
      P I T G E N I R P F I S R C A V C E A P A M V M A V H S Q T I Q I P P C P S G M S S L M I G Y S F V

   CB3 ----------------------- CB4 -----------

                        160                 170                 180                 190                 200
      M H T S A G A E G S G Q A L A S P G S C L E E F R S A P F I E C H G R G T C N Y Y A N A Y S F M L A

   CB5 ---------------
                                                                                                  o-JBS5 --
                                                      T9 -----      T10 -----

                        210                 220                 230
      T I E R S E M F K K P T P S T L K A G E L R T H V S R C Q V C M R R T

                CB6 ----------
o-JBS5 ------------------------------------
                                                  CPP <<<
```

Abb.38 Vollständige Sequenz von α1(IV)NC1. Die proteinchemisch nicht abgedeckten Lücken wurden mit cDNA-Sequenzen von humanen Fibroblasten (80,81) überbrückt.
Gezeigt sind die Positionen der sequenzierten BrCN- (CB), o-Jodosobenzoesäre- (o-JBS) und Trypsin- (T) Peptide, weiterhin die N-terminalen Sequenzen der α1-Kette (Chain) und Sequenzen, erhalten durch Carboxypeptidase P Abbau (CPP; vgl. Kap. 3.2.7.).
$\overset{+}{P}$ = Hydroxyprolin

werden konnte (83). Hiermit konnte die Lage aller sequenzierter Peptide von α1(IV)NC1, wie in Abbildung 37 dargestellt, festgelegt werden.

Die tryptischen Peptide der α1-Kette wurden bei der Suche nach quervernetzten Peptiden in Kap. 3.2.9.2. erhalten. Der C-Terminus wurde durch Sequenzierung von o-JBS5 und durch Carboxypeptidase Abbau der α1-Kette (s.Kap.3.2.7.) bestimmt.

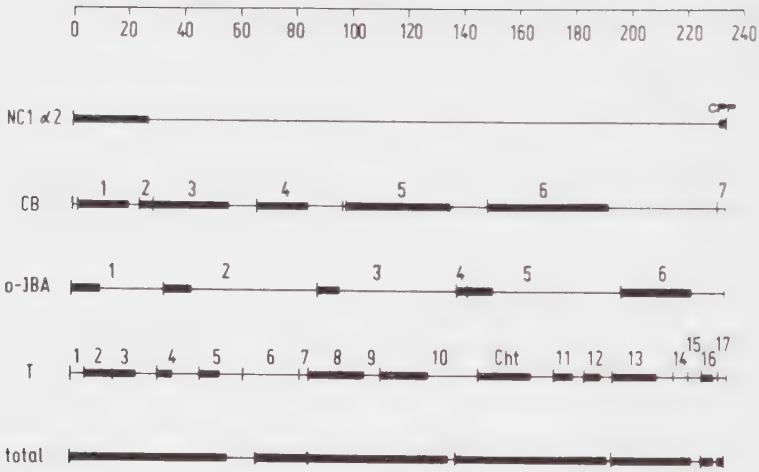


Abb.39 Schematische Darstellung der Positionen der mit BrCN (CB), o-JBS (o-JBS) und Trypsin (T) hergestellten Peptide von α2(IV)NC1; die Positionen konnten durch die hohe Homologie zur Sequenz von α1(IV)NC1 festgelegt werden.

Abbildung 38 zeigt die vollstandige humane Sequenz, wobei die nach Peptidsequenzierung fehlenden Aminosauren mit Hilfe der spater bekannt gewordenen cDNA-Sequenz von humanen Fibroblasten (80,81) vervollstandigt werden konnten.

Die einzelnen Peptide der verschiedenen Spaltungen von α2(IV)NC1 ließen eine so hohe Homologie zu α1(IV)NC1 erkennenen, daß ihre Lage durch einen einfachen Sequenzvergleich festgelegt werden konnte (Abb.39). Der C-Terminus wurde bestimmt durch Sequenzierung von T16 und direkt mit Carboxypeptidase P (s.Kap.3.2.7.). Vier Lucken von 9, 2, 1

und 3 Aminosauren konnten mit proteinchemischen Methoden nicht geschlossen werden. Abbildung 40 zeigt die gesamte Sequenz der menschlichen α2-Kette der NC1-Domäne, wobei die Lücken mit den entsprechenden Positionen der aus cDNA-Sequenzen von Maustumorzellen abgeleiteten Aminosäure-sequenz besetzt wurden (82). Die Verwendung von Maussequen-zen ist ohne weiteres möglich, da die bisher bekannten Sequenzen des Typ IV Kollagens hohe Homologien zwischen Mensch und Maus aufweisen (46).

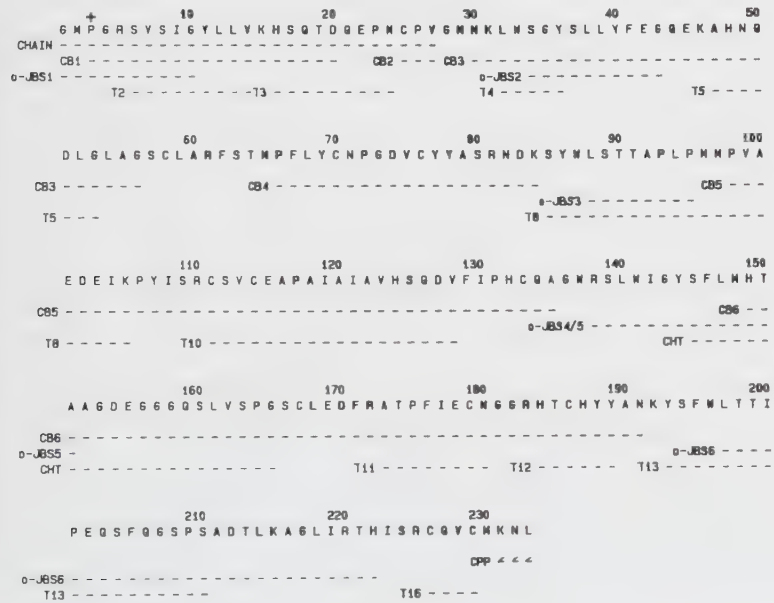


Abb.40 Vollständige Sequenz von α2(IV)NC1. Die proteinchemisch nicht abgedeckten Lücken wurden mit Aminosäuresequenzen überbrückt, die aus cDNA-Sequenzen von Maustumorzellen abgeleitet wurden (82). Gezeigt sind die Positionen der sequenzierten BrCN- (CB), o-Jodosobenzoesäure- (o-JBS) und Trypsin- (T) Peptide, weiterhin die N-terminalen Sequenzen der α1-Kette (Chain) und Sequenzen, erhalten durch Carboxypeptidase P Abbau (CPP; vgl. Kap. 3.2.7.). P = Hydroxyprolin

3.2.7. Bestimmung des C-Terminus von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1

Bei den fibrillenbildenden Kollagenen fungieren die der NC1-Domane entsprechenden C-terminalen Domanen als Propeptide, welche vor der Fibrillenbildung von der Tripelhelix abgetrennt werden. Es bestand die Frage, ob auch beim Typ IV Kollagen ein, wenn auch viel kleineres Peptidstuck als Propeptid abgespalten wird. Durch die von cDNA abgeleiteten Sequenzen der NC1-α1- und NC1-α2-Ketten aus Maus war die translatierte Peptidkette bis zum Stopcodon bekannt. Um festzustellen, ob die α1- und die α2-Peptidketten aus der fertig prozessierten NC1-Domäne auf der Proteinebene bis zum Stopcodon reichen oder vorher enden, wurden die α-Ketten mit Carboxypeptidase P inkubiert.
Dieser Versuch ergab für die α1-Kette die C-terminale Sequenz Arg-Arg-Thr-C und für die α2-Kette Lys-Asp-Leu-C. Die zeitliche Abhangigkeit der Freisetzung einzelner Aminosauren durch Reaktion mit Carboxypeptidase P ist in Abbildung 41 fur beide Ketten dargestellt. Eine Inkubation mit einem Gemisch aus den Carboxypeptidasen A und B lieferte die gleichen Ergebnisse, war aber durch den hohen Gehalt an storenden Salzen (4M Harnstoff) schwieriger auswertbar.

Mit dem Ergebnis dieses Experimentes und der Sequenz der Peptide o-JBS5 (α1-Kette) bzw. o-JBS6 und T16 (α2-Kette) konnte der C-terminale Bereich der Ketten bestimmt werden (s.Abb.38,40, S.83/85). Die Längen der NC1-α1- und NC1-α2-Ketten entsprechen der durch cDNA Untersuchung

festgestellten Längen. Somit ist eine C-terminale Proform des Typ IV Kollagens ausgeschlossen.

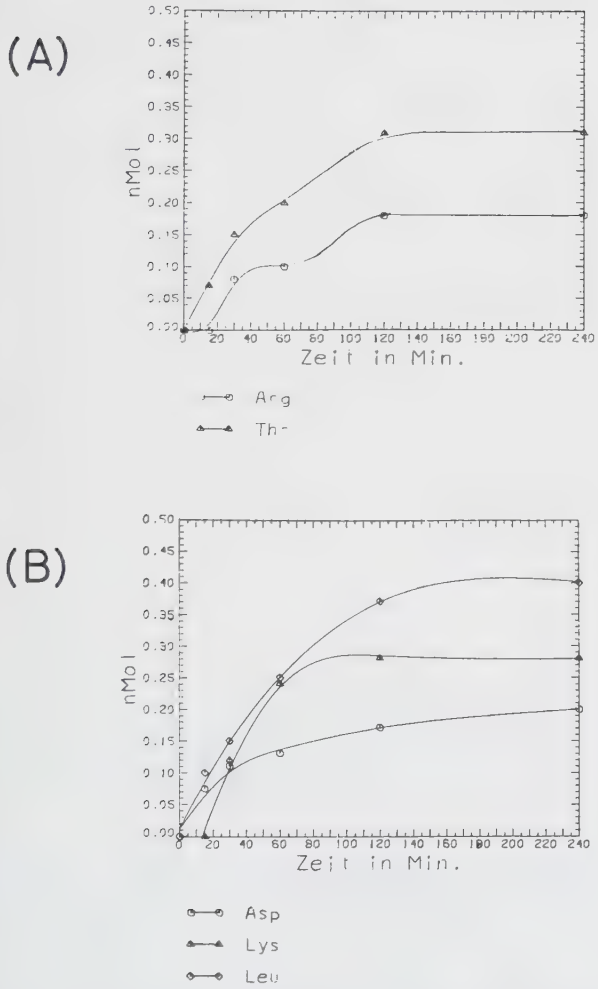


Abb.41 Zeitliche Abhängigkeit der Freisetzung von C-terminalen Aminosäuren durch Carboxypeptidase P.
(A) α1(IV)NC1
(B) α2(IV)NC1

3.2.8. Homologieuntersuchungen an NC1-α-Ketten

Die uberlappung der N-terminalen Aminosauren der NC1-Domane mit elf C-terminalen Aminosauren des 914-Reste langen Pepsin Fragmentes der α1-Kette aus menschlichem Typ IV Kollagen (45) zeigt, daß sich die NC1-Domane unmittelbar an den tripelhelikalen Bereich des Typ IV Kollagens anschließt.

Die Auswertung der Aminosauresequenz mit Homologieanalysen lieferte drei interessante Punkte:

1) Der ketteninterne Vergleich der α1- und der α2-Kette ergab, daß beide Ketten der NC1-Domane aus zwei sich wiederholenden, homologen Einheiten A und B bestehen. Ein Vergleich von A und B zeigte, daß 39% bzw. 37% der Aminosäuren identisch und 21% bzw. 15% konservativ ausgetauscht sind (Abb.42). Besonders markant sind die identischen Positionen der sechs Cysteine in jeder Untereinheit.

2) Ein Vergleich der α1- und der α2-Kette von Mensch zeigte eine hohe Ähnlichkeit. So sind 61% der Aminosauren identisch und 17% der Aminosauren konservativ ausgetauscht (Abb.43, S.91).

3) Eine besonders hohe Ähnlichkeit findet sich bei einem interspezies Vergleich zwischen den α1- bzw. α2-Ketten aus Mensch und Maus. 97% der humanen Sequenz der α1- und 95% der humanen Sequenz der α2-Kette sind identisch zu den entsprechenden Maussequenzen (Abb.44 A und B, S.92/93), was das Alignment der Peptide, erhalten aus humanem Material, mit den Maussequenzen rechtfertigt. Von den nicht identischen Aminosauren (3% bzw. 5%) sind in beiden Ketten

(A)

```
          1                   .                   .
NC1 α1A   S V D H G F L V T R H S Q T I D D P Q C P S G T K
NC1 α1B   - E A P A M V M A V H S Q T I Q I P P C P S G W S
                  *   * * *   H S Q T I *   P   C P S G
           112

          26        .                   .                   .
NC1 α1A   I L Y H G Y S - L L Y V Q G N E R A H G Q D L G T
NC1 α1B   S L W I G Y S F V M H T S A G A E G S G Q A L A S
            L     G Y S   * *       *     *   G Q   L * *
         136

          50                  .                   .
NC1 α1A   A G S C L R K F S T M P F L F C N I N N V C N F A
NC1 α1B   P G S C L E E F R S A P F I E C H G R G T C N Y Y
            G S C L     F   *   P F *   C *         C N *
         161

          75        .                   .                   .
NC1 α1A   S R N D Y S Y W L S T P E P M P M S M A P - - - -
NC1 α1B   A - N A Y S F W L A T I E R S E M F K K P T P S T
          *   N   Y S * W L * T   E       M       P
         185

          96                  .                   .
NC1 α1A   I - T G E N I R P F I S R C A V C G - - -
NC1 α1B   L K A G E - L R T H V S R C Q V C M R R T
          *   * G E   * R     * S R C   V C
         210
```

(B)

```
          1                   .                   .
NC1 α2A   V S I G Y L L V K H S Q T D Q E P M C P V G M N K
NC1 α2B   - - - A I A I A V H S Q D V F I P H C Q A G W R S
                *     *     H S Q         P   C     G
              112

          26        .                   .                   .
NC1 α2A   L W S G Y S - L L Y F E G Q E K A H N Q D L G L A
NC1 α2B   L W I G Y S F L M H T A A G D E G G G Q S L V S P
          L W   G Y S   L *       *   *   *     Q   L     *
         134

          50                  .                   .
NC1 α2A   G S C L A R F S T M P F L Y C N P G - D V C Y Y A
NC1 α2B   G S C L E D F R A T P F I E C N G G R H T C H Y Y
          G S C L     F   *   P F *   C N   G   *   C   Y
         159

          74        .                   .                   .
NC1 α2A   S R N D K - S Y W L S T T A P - - - - - - - L P M
NC1 α2B   A - N - K Y S F W L - T T I P E Q S F Q G S P S A
          *   N   K   S * W L   T T   P
         184

          91                  .                   .
NC1 α2A   M P V A E D E I K P Y I S R C S V C E A P -
NC1 α2B   D T L K A G L I R T H I S R C Q V C M K N L
              *     *   I *     I S R C   V C
         206
```

Abb.42 (vorige Seite) Intraketten Homologie von α1(IV)NC1 (A) und von α2(IV)NC1 (B).
Die Nummerierung bezieht sich auf die nicht tripelhelikale Sequenz der NC1-Domane. Beide Ketten werden aus zwei homologen Halften A und B aufgebaut. Die Analyse wurde mit dem Programm ALIGN (84) durchgefuhrt. Verwendet wurde die Dayhoff mutation data matrix und 12 Strafpunkte für eine Unterbrechung.
Identische Aminosäuren sind in der 3. Zeile aufgeführt.
Substitutionen mit einem positiven score (Dayhoff Mutation Data Matrix) werden als konservativ bezeichnet und sind mit * markiert.

mehr als 50% konservativ ausgetauscht. Die C-terminale NC1-Domäne stellt in Form, Größe, Position und in ihrer Funktion die den C-terminalen Propeptiden der fibrillenbildenden Kollagene analoge Domäne dar. So nimmt man an, daß die NC1-Domäne, ähnlich wie die C-terminalen Carboxypropeptide, verantwortlich ist für die richtige Zusammenlagerung der α1- und α2-Ketten vor der Tripelhelixbildung. Es lag daher nahe, eine Homologieuntersuchung zwischen den Carboxypropeptiden und der NC1-Domäne durchzuführen. Sie sei nun beispielhaft an Typ I Kollagen beschrieben.

Aus der Literatur war bekannt, daß zwischen den Carboxypropeptiden eine hohe Homologie vorliegt (86). Nach einer Analyse der α1(I)- und α2(I)-Carboxypropeptide mit dem RELATE Programm (87), erhielt ich in Einheiten der Standardabweichung einen Wert von 27.8 (SD). Die gleiche Berechnung für die α1- und α2-Ketten der NC1-Domane lieferte einen Wert von 30.0 (SD). Die Homologie der Carboxypropeptid-α-Ketten des Typ I Kollagens ist somit ahnlich hoch wie die der Typ IV NC1-α-Ketten.

```
          1                   .                   .
NC1 α1    G P P G T P S V D H G F L V T R H S Q T I D D P Q
NC1 α2    G M P G R - S V S I G Y L L V K H S Q T D Q E P M
                      S V     G * L *   * H S Q T   * * P
          1

          26        .                   .                   .
NC1 α1    C P S G T K I L Y H G Y S L L Y V Q G N E R A H G
NC1 α2    C P V G M N K L W S G Y S L L Y F E G Q E K A H N
          C P   G   *   L     G Y S L L Y   * G * E * A H
          25

          51                  .                   .
NC1 α1    Q D L G T A G S C L R K F S T M P F L F C N I N N
NC1 α2    Q D L G L A G S C L A R F S T M P F L Y C N P G D
          Q D L G   A G S C L   * F S T M P F L * C N     *
          50

          76        .                   .                   .
NC1 α1    V C N F A S R N D Y S Y W L S T P E P M P M S M A
NC1 α2    V C Y Y A S R N D K S Y W L S T T A P L P - - M M
          V C   * A S R N D   S Y W L S T     P * P     M
          75

         101                  .                   .
NC1 α1    P I T G E N I R P F I S R C A V C E A P A M V M A
NC1 α2    P V A E D E I K P Y I S R C S V C E A P A I A I A
          P * *   * * I * P * I S R C * V C E A P A *   * A
          98

         126        .                   .                   .
NC1 α1    V H S Q T I Q I P P C P S G W S S L W I G Y S F V
NC1 α2    V H S Q D V F I P H C Q A G W R S L W I G Y S F L
          V H S Q   *   I P   C   * G W   S L W I G Y S F *
         123

         151                  .                   .
NC1 α1    M H T S A G A E G S G Q A L A S P G S C L E E F R
NC1 α2    M H T A A G D E G G G Q S L V S P G S C L E D F R
          M H T * A G   E G * G Q * L   S P G S C L E * F R
         148

         176        .                   .                   .
NC1 α1    S A P F I E C - H G R G T C N Y Y A N A Y S F W L
NC1 α2    A T P F I E C N G G R H T C H Y Y A N K Y S F W L
          * * P F I E C     G R   T C * Y Y A N   Y S F W L
         173

         200                  .                   .
NC1 α1    A T I E R S E M F K K P T P S T L K A G E L R T H
NC1 α2    T T I P E Q S F Q G S P S A D T L K A G L I R T H
          * T I               P *     T L K A G   * R T H
         197

         225        .
NC1 α1    V S R C Q V C M R R T
NC1 α2    I S R C Q V C M K N L
          * S R C Q V C M *
         223
```

Abb.43 (vorige Seite) Interketten Homologie zwischen α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1.
Analysenbedingungen und Markierung wie in Abb.42.

```
  1  G P P G T P S V D H G F L V T R H S Q T I D D P Q C P S G T
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T - - - L - - P - -

 31  K I L Y H G Y S L L Y V Q G N E R A H G Q D L G T A G S C L
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

 61  R K F S T M P F L F C N I N N V C N F A S R N D Y S Y W L S
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

 91  T P E P M P M S M A P I T G E N I R P F I S R C A V C E A P
     - - - - - - - - - - - - S - D - - - - - - - - - - - - - - -

121  A M V M A V H S Q T I Q I P P C P S G W S S L W I G Y S F V
     - - - - - - - - - - - - - - Q - - N - - - - - - - - - - - -

151  M H T S A G A E G S G Q A L A S P G S C L E E F R S A P F I
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

181  E C H G R G T C N Y Y A N A Y S F W L A T I E R S E M F K K
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

211  P T P S T L K A G E L R T H V S R C Q V C M R R T
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
```

Abb.44 A Interspezies Homologie zwischen α1(IV)NC1 von Mensch (Proteinsequenz, obere Zeile) und Maus (cDNA abgeleitete Sequenz, untere Zeile). Für die Maussequenz sind nur die nicht identischen Positionen angegeben. Die Lücken der Proteinsequenz wurden mit Sequenzen aus Arbeiten von Brinker et.al. (80) und Pihlajaniemi et.al. (81) angefüllt.
97% der Aminosäuren sind identisch.
Analysenbedingungen wie in Abb.42.

```
  1  G M P G R S V S I G Y L L V K H S Q T D Q E P M C P V G M N
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

 31  K L W S G Y S L L Y F E G Q E K A H N Q D L G L A G S C L A
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

 61  R F S T M P F L Y C N P G D V C Y Y A S R N D K S Y W L S T
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

 91  T A P L P M M P V A E D E I K P Y I S R C S V C E A P A I A
     - - - - - - - - L - - E - - - - - - - - - - - - - - - V -

121  I A V H S Q D V F I P H C Q A G W R S L W I G Y S F L M H T
     - - - - - - - T S - - - - P - - - - - - - - - - - - - - - -

151  A A G D E G G G Q S L V S P G S C L E D F R A T P F I E C N
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

181  G G R H T C H Y Y A N K Y S F W L T T I P E Q S F Q G S P S
     - - - G - - - - F - - - - - - - - - - - - - - N - - S T - -

211  A D T L K A G L I R T H I S R C Q V C M K D L  233
     - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N -
```

Abb.44 B Interspezies Homologie zwischen α2(IV)NC1 von Mensch (Proteinsequenz, obere Zeile) und Maus (cDNA abgeleitete Sequenz, untere Zeiele).
Für die Maussequenz sind nur die nicht identischen Positionen angegeben.
95% der Aminosäuren sind identisch.
Analysenbedingungen wie in Abb.42.
Die fehlenden 7% der humanen Sequenz (Pos. 57-65, 136-137, 192, 223-225, vgl. Abb.40, S.85) wurden mit Maussequenzen gefüllt und gehen daher nicht in die Berechnung ein.

Vergleicht man die NC1-Domane mit den Carboxypropeptiden der fibrillenbildenden Kollagene, so laßt sich keine globale Homologie feststellen. Z.B. existiert bei den Carboxypropeptiden keine sich wiederholende Einheit. Jedoch findet sich ein lokaler, kurzer Bereich, der eine signifikante Ahnlichkeit aufweist. Die Aminosaure-Positionen 63-95 der Propeptide der α1-Kette von Typ I und Typ III Kollagen und die Positionen 68-100 der α1-Kette von Typ II zeigen eine mäßig signifikante Homologie zu den Abschnitten A (Pos.64-97) bzw. B (Pos. 175-207) der α1-Kette der NC1-Domäne (Abb.45 A bzw. B, S.95). Es ist besonders interessant, daß diese zur NC1-Domane homologen Sequenzabschnitte der Carboxypropeptide aus einem fur alle Carboxypropeptide besonders konservierten, d.h. homologen Bereich stammen.

Vergleicht man dagegen die α2-Kette der NC1-Domane mit den Propeptiden, so erhalt man andere Ergebnisse. Der der α1-Kette entsprechende Abschnitt der α2-Kette (Pos.65-97, vgl. Abb.45 C, S.95) zeigt keine Ahnlichkeit zu den eben beschriebenen Positionen der α1-Ketten von Typ I, II, III und auch nicht zu der entsprechenden Position der α2-Kette von Typ I. Stattdessen findet man eine Ahnlichkeit zu einem anderen Abschnitt (Pos.154-186) der α2(I)-Kette. Die Werte samtlicher Vergleiche sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

(A)

NC1	(IV)	α1(64- 97)	S T M P F L F C N I N N V C N F A S R N D Y S Y W L S T P E P M P M
ProC	(I)	α1(63- 95)	R K N P A R T C R D L K M C H G D W K S G - D Y W I D P N Q G C N L
ProC	(II)	α1(68-100)	K K N P A R T C R D I K L C H P G W K S G - D Y W I D P N Q G C T L
ProC	(III)	α1(63- 95)	R K N P A R N C R D L K F C H P E L K S G - E Y W I D P N Q G C K M

(B)

NC1	(IV)	α1(175-207)	R S A P F I E C H G R G T C N Y Y A N A Y S F W L A T I E R S E M
ProC	(I)	α1 (63- 95)	R K N P A R T C R D L K M C H G D W K S G D Y W I D P N Q G C N L
ProC	(II)	α1 (68-100)	K K N P A R T C R D I K L C H P E W K S G D Y W I D P N Q G C T L
ProC	(III)	α1 (63- 95)	R K N P A R N C R D L K F C H P E L K S G E Y W I D P N Q G C K M

(C)

NC1	(IV)	α2 (65- 97)	M P F L Y C N P G D V C Y Y A S R N D K S Y W L S T T A P L P M M
ProC	(I)	α2(154-186)	M R L L A N H A S Q N I T Y H C K N S I A Y M D E E T G N L K K A

Abb.45 Vergleich einiger Partialsequenzen aus den Carboxy-Prokollagenen der fibrillenbildenden Kollagene und der NC1-Domäne.
(A) = α1(IV)NC1, Abschnitt A, Pos.64-97;
(B) = α1(IV)NC1, Abschnitt B, Pos.175-207;
(C) = α2(IV)NC1, Pos.65-97;
ProC=Carboxypropeptid;
Positionen der Fragmente sind in Klammern angegeben;
fett gedruckt sind identische Aminosäuren;
schrag gedruckt sind konservativ substituierte Aminosäuren.

(A)

α1(IV) NC1	- α2(IV) NC1	=	30.0 SD
α1(I) ProC	- α2(I) ProC	=	27.8 SD
α1(I) ProC	- α1(II) ProC	=	33.1 SD
α1(I) ProC	- α1(III) ProC	=	29.8 SD
α1(II) ProC	- α1(III) ProC	=	30.2 SD

(B)

	α1(I) ProC (63-95)	α2(I) ProC (154-186)	α1(II) ProC (68-100)	α1(III) ProC (63-95)
α1(IV) NC1 (64-97)	3.9	---	4.3	3.3
α1(IV) NC1 (175-207)	4.3	---	3.6	4.6
α2(IV) NC1 (65-97)	---	4.1	---	---

Tab.8 Ergebnisse der Homologieuntersuchungen an C-Prokollagenen (ProC) des Typs I, II und III und der NC1-Domäne (Typ IV).
Werte in Einheiten der Standardabweichung (SD).
(A) Vergleich der C-terminalen, globulären Polypeptidketten der Prokollagentypen I-III und des Typ IV Kollagens. Nach optimalem Alignment wurden Lucken entfernt und die Ketten auf die Einheitslänge 227 Aminosäuren gekürzt. Die Analyse wurde mit dem Programm RELATE (87) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Dayhoff Mutation Data Matrix, 100 Zufallsanalysen mit einem Fenster von 227 Aminosauren.
(B) Werte lokaler Homologien der NC1-Domäne und der Carboxypropeptide von Abbildung 45. Dieses Alignment wurde mit dem Programm ALIGN unter folgenden Bedingungen erreicht: Dayhoff Mutation Data Matrix, 12 Strafpunkte für eine Lücke, 100 Zufallsalignments.

Vergleicht man hydrophile und hydrophobe Bereiche der beiden Ketten der NC1-Domane, so wird ihre Verwandtschaft noch einmal sehr deutlich. Die in den untersten Diagrammen (Feld H) der in Abbildung 58 (S.116) dargestellten Hydropathie-Profile der beiden Ketten wurden entsprechend Kyte und Doolittle (77) durch Mittelung der einzelnen Aminosäurewerte über neun Aminosäuren erhalten. Sie zeigen, daß die Bereiche, in denen hydrophile bzw. hydrophobe Aminosäuren uberwiegen, in beiden Ketten offensichtlich an den gleichen Positionen liegen. Hydrophobe Abschnitte überwiegen in ihrer Zahl, aber auch in ihrer Länge, besonders im mittleren Bereich zwischen Position 100 und 180. Vielleicht läßt sich hiermit das relativ schlechte Trennverhalten der BrCN- und o-JBS-Peptide bzw. ihre Tendenz zur Selbstaggregation erklären. Hydrophile Bereiche treten in beiden Ketten vor allem um die Positionen 20, 48, 83, 187 und 210 auf.

In Feld B der Abbildung 58 ist das Ergebnis für die Vorhersage von Sekundärstrukturen, berechnet nach der Methode von Chou und Fasman, als Graph dargestellt (nähere Beschreibung siehe 3.2.10.). Die Vorhersage ergibt in beiden Ketten häufig identische Bereiche fur Turns, aber auch fur α-Helix und β-Faltblatt Strukturen. Man erkennt hierbei also auch eine Homologie in der Sekundärstruktur der Ketten.
Analoge Untersuchungen an den Carboxypropeptiden der fibrillenbildenden Kollagene machen den Unterschied zwischen diesen und der NC1-Domäne erneut deutlich. Alle Propeptide zeigen ausgesprochen hydrophilen Charakter und eine ganz andere Anordnung von vorhergesagten Sekundarstrukturen.

Die Suche nach Homologien oder partiellen Homologien der NC1-α-Ketten zu Proteinen in der Proteindatenbank der NBRF (s. Methoden) lieferte keine sinnvollen, signifikanten Ergebnisse.

3.2.9. Untersuchung von Quervernetzungen der NC1-Domane

Wie gezeigt, wird die Aggregation zweier Typ IV Kollagen Molekule uber die C-terminale Domane durch Disulfidbindungen stabilisiert. Dagegen treten nach Bachinger et.al. (93) im NC1-Bereich des monomeren Typ IV Kollagens keine Disulfidbrucken zwischen zwei α-Ketten auf. Um diese Interaktion uber die C-Termini naher zu untersuchen, sollte die Lage der Disulfidbrucken geklart werden. Es wurden daher zunachst intraketten, anschließend interketten Disulfidbrukken untersucht.

3.2.9.1. Intraketten Disulfidbrücken der NC1-Domane

Die Strategie war, zunachst die unreduzierten NC1-Domanen der α1- und α2-Ketten mit BrCN zu spalten, disulfidverbruckte Peptide zu isolieren und ihre Zusammensetzung durch Bestimmung der N-terminalen Aminosauresequenz zu klaren. Die so gewonnene Information uber die Lage der Disulfidbrucken sollte anschließend durch Reduktion der einzelnen Peptide bestatigt werden.

Das Problem einer unvollstandigen Spaltung mit BrCN nach Oxidation von Methioninen durch Luftsauerstoff wurde erfolgreich umgangen, indem frisch hergestellte Ketten verwendet und unter N_2-Schutz gearbeitet wurde.

Die α1-Kette enthält acht Methioninreste, welche durch Behandlung mit BrCN zu sechs großen BrCN-Peptiden fuhren (vgl.Abb.37, S.82). Durch Kenntnis der Sequenz der NC1-Domane kann jedes BrCN-Peptid der α1-Kette durch Sequenzierung identifiziert werden.

Das BrCN-Peptidgemisch der nicht reduzierten α1-Kette konnte nur an TSK Saulen in 4M Guanidiniumhydrochlorid aufgetrennt werden, was, wie in Abbildung 46 zu sehen, zu fünf

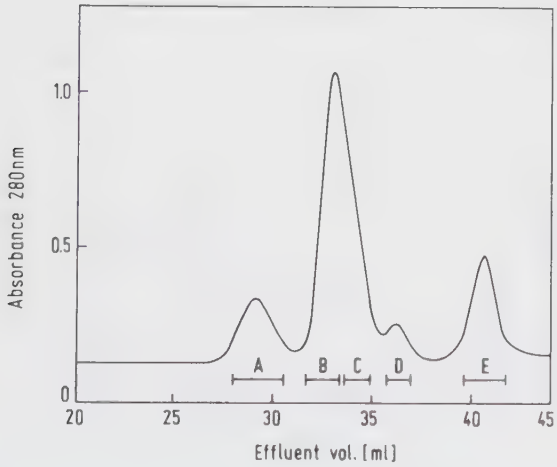


Abb.46 Chromatographie des Gemisches von intraketten disulfidquervernetzten BrCN Peptiden von α1(IV)NC1 mit zwei TSK 2000 Gelfiltrationssaulen; equilibriert in 4M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3.5. Fraktionen A-E siehe Text.

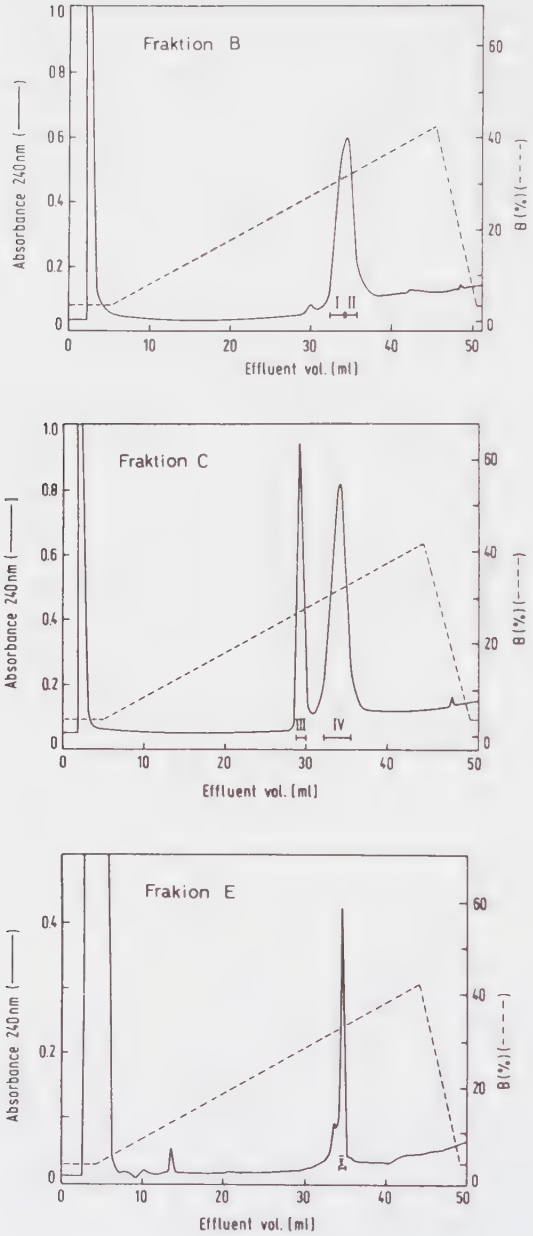


Abb.47 Rechromatographie der Fraktionen B, C und E der Abb.46 an C18 reversed phase Säule.
Bedingungen wie in Abb.9B, S.27.
Fraktionen I, II und IV enthalten CB4/CB5/CB6;
Fraktion III enthält CB1/CB3;
Fraktion V enthält CB2.

Fraktionen A-E führte. Abbildung 47 zeigt die Rechromatographien der Fraktionen B, C und E an einer C18 reversed phase HPLC Saule. Die Sequenzierung der dabei auftretenden Fraktionen erbrachte folgendes Ergebnis:

Fraktion I, II und IV enthielten das Tripelpeptid CB4/CB5/CB6, Fraktion III das Doppelpeptid CB1/CB3 und Fraktion V CB2. Dieses Ergebnis wurde nun durch Reduktion der dimeren und trimeren BrCN-Peptide kontrolliert. Hierzu wurden diese Peptide mit DTT reduziert und mit NaJOAc carboxymethyliert. Die dabei entstehenden Gemische wurden an

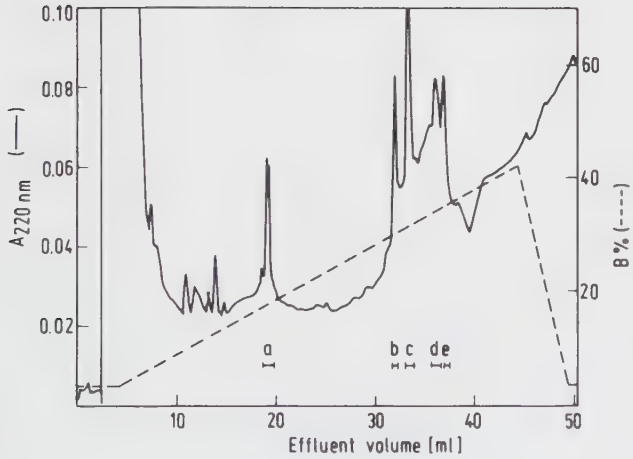


Abb.48 Profil der reversed phase HPLC Trennung der Fraktionen I, II und IV der BrCN gespaltenen NC1-α1-Kette aus Abb.47 nach ihrer Reduktion.
Bedingungen wie in Abb.9B, S.27.
Fraktion a enthält CB6;
Fraktionen b und c enthalten CB5;
Fraktionen d und e enthalten CB4.

einer C18 reversed phase HPLC Saule aufgetrennt, wobei ubersichtliche Profile entstanden. Die Fraktionen I, II und IV der Abbildung 47 ergaben auf diese Weise funf Hauptfraktionen a-e (Abb.48). Nach Sequenzierung enthielten Fraktion a CB6, die Fraktionen b und c CB5 und die Fraktionen d und e CB4. Fraktion III aus Abbildung 47 konnte auf gleiche Weise zu zwei Fraktionen f und g aufgetrennt werden (Abb.49), die aus CB3 bzw. CB1 bestanden. Der große Unterschied der Flachen unter den Peaks ruhrt daher, daß CB1 ca. 3mal so groß wie CB3 ist und 5mal mehr aromatische

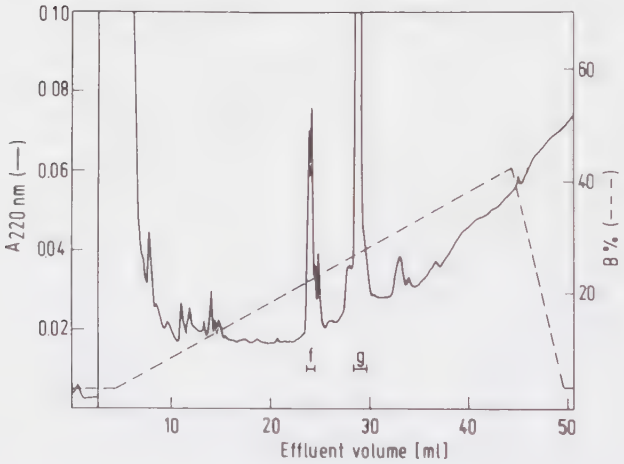


Abb.49 Profil der reversed phase HPLC Trennung der Fraktion III der BrCN gespaltenen NC1-α1-Kette aus Abb.47 nach ihrer Reduktion.
Bedingungen wie in Abb.9B, S.27.
Fraktion f enthält CB3;
Fraktion g enthält CB1.

Aminosäuren enthält. Die Aufspaltung der BrCN-Peptide meist in zwei Peaks ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß an ihren C-Termini sowohl Homoserin als auch Homoserinlacton vorlagen. Da Fraktion V aus Abbildung 47 nur CB2 enthielt und sich die Retentionszeit durch die Reduktion nur unwesentlich änderte (keine Abb.), wurde darauf verzichtet, diese Fraktion zu sequenzieren.

Die Molekularsiebchromatographie des BrCN-Peptidgemisches der nicht reduzierten α2-Kette lieferte nur zwei Fraktionen (nicht abgebildet), wobei die Hauptfraktion im Elektropherogramm vor Reduktion zwei breite Banden und nach Reduktion fünf Banden zeigt. Nach Rechromatographie an einer C18 reversed phase HPLC Säule und Sequenzierung konnten die beiden Peptide CB1 und CB4 sowie das Tetrapeptid CB2/CB3/CB5/CB6 identifiziert werden.

Zusätzliche Spaltversuche mit Trypsin, Staphyloccocus aureus V8 Protease und Pepsin führten nicht zum Erfolg, da es große Schwierigkeiten bei der Auftrennung und Identifizierung der Fragmente gab.

B.2.9.2. Lokalisierung der intraketten Disulfidbrücken

Durch die beschriebenen Versuche war es moglich, die in Abb.50 gezeigte Verknüpfung der Cysteinreste zu bestimmen. Das Peptid α1(IV)NC1 CB2 wurde als einzelnes Peptid isoliert und identifiziert. Somit ist Cystein 71 mit Cystein 77 uber eine Disulfidbrucke verknupft, was zu einem kleinen Loop aus

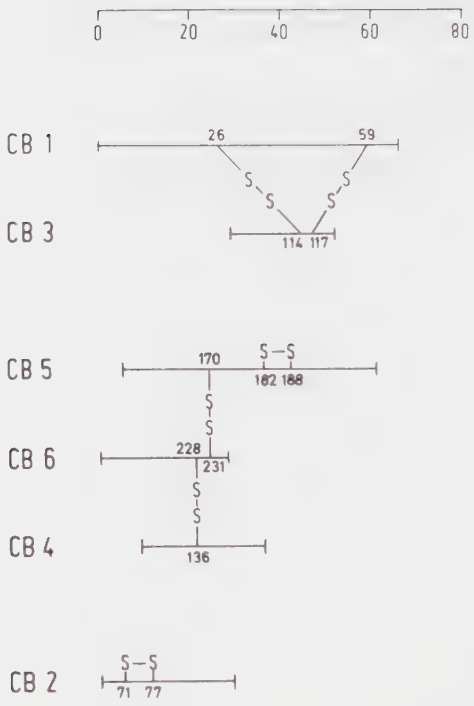


Abb.50 Schematische Darstellung der uber Disulfidbrucken vernetzten BrCN Peptide von α1(IV)NC1. Die Zahlen geben die Positionen der Cysteine in der Aminosäuresequenz der Kette an.
Unsicher sind die Disulfidbrucken zu Cystein 114,117 bzw 228,231; sie konnen auch vertauscht mit ihren gegenuberliegenden Cysteinen (Position 26,59 bzw. 136,170) reagieren.
-S-S- = Disulfidbrücken

funf Aminosauren führt. CB1 konnte zusammen mit CB3 isoliert werden. Das bedeutet, daß Cystein 26 und Cystein 59 mit Cystein 114 oder Cystein 117 je eine Disulfidbrücke bilden. Welches Cystein genau mit welchem reagiert, konnte nicht

festgestellt werden, da zwischen Cystein 114 und Cystein 117 keine geeignete Spaltstelle existiert, die eine Nachspaltung ermöglicht hätte. Ausgehend von der Tatsache, daß die Positionen der sechs Cysteine (Pos. 26, 59, 71, 77, 114 und 117) in der ersten Hälfte des Moleküls völlig identisch zu den Positionen der sechs Cysteine (Pos. 136, 170, 182, 188, 228 und 231) in der zweiten Hälfte des Moleküls sind und man daher annehmen konnte, daß beide Hälften homolog disulfidquervernetzt sind, konnte die gemeinsame Isolierung der BrCN-Peptide CB4, CB5 und CB6 von α1(IV)NC1 dahingehend

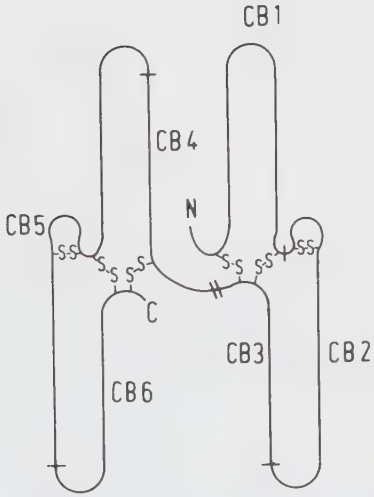


Abb.51 Modell der intraketten Disulfidverbrückung der α1(IV)NC1-Domäne. Die Positionen der BrCN-Peptide sind mit "CB" angegeben, die der Methionine mit Balken. -S-S = Disulfidbrücken.

interpretiert werden, daß Cystein 182 mit Cystein 188 sowie Cystein 136 und Cystein 170 mit Cystein 228 oder Cystein 231 disulfidverbrückt sind.

Diese Verknupfung von BrCN-Peptiden erlaubt eine Rekonstruktion der NC1 α1-Kette in einem Modell, wie es in Abbildung 51 dargestellt ist. Die Art der Verbruckung der BrCN-Peptide laßt nur dieses eine Modell zu. Man erkennt in

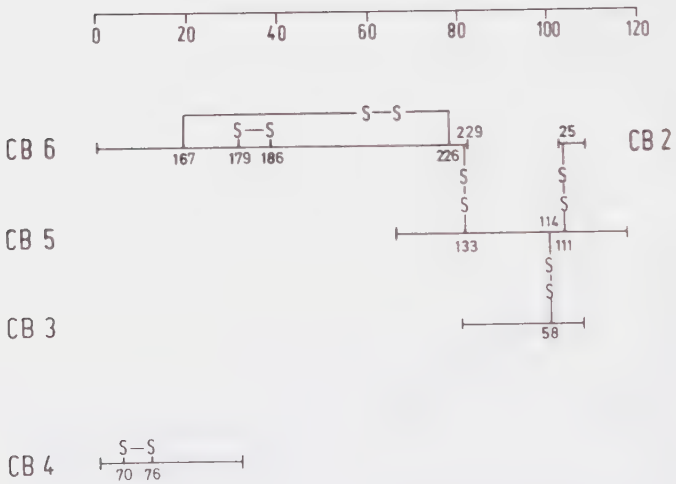


Abb.52 Schematische Darstellung der uber Disulfidbrücken vernetzten BrCN Peptide von α2(IV)NC1. Die Zahlen geben die Positionen der Cysteine in der Aminosauresequenz der Kette an.
Unsicher sind die Disulfidbrücken zu Cystein 112,115 bzw 227,230; sie können auch vertauscht mit ihren gegenüberliegenden Cysteinen (Position 25,59 bzw. 134,168) reagieren.
-S-S- = Disulfidbrücken

beiden Halften der Kette eine Konzentrierung von Disulfidbrücken - einen Disulfidknoten, gebildet aus den Cysteinen 25, 59, 114 und 117 bzw. 136, 170, 228 und 231.

Die starke Homologie der Cysteinpositionen der beiden α-Ketten ließ auf eine identische Verteilung ihrer intraketten Disulfidbrücken schließen. Dies wurde bestätigt durch die Isolierung der Peptide CB4 und CB1 und des Tetrapeptides CB2/CB3/CB5/CB6 aus α2(IV)NC1. Wie in Abbildung 52 gezeigt, bedeutet das, daß die beiden in CB4 enthaltenen Cysteine 70 und 76 disulfidverbrückt sind und so einen kleinen Loop aus fünf Aminosäuren bilden. CB1 α2(IV)NC1 besitzt kein Cystein.
Wie in Abbildung 52 weiter zu sehen ist, läßt sich auch das Auftreten des Tetrapeptides CB2/CB3/CB5/CB6 durch eine der α1-Kette analoge Verknüpfung der Cysteinreste erklären.
Unterstützt wird die Vorstellung über die Anordnung der Disulfidbrücken durch die Isolierung disulfidverknüpfter Trypsinpeptide (s. Kap.3.2.5.). Das Doppelpeptid T11/T12 bestätigt den durch Cystein 179 und 186 gebildeten Loop, und das Pentapeptid T3/T5/T10/Cht/T16 gibt einen Hinweis für die Richtigkeit sowohl der Verbrückung von Cystein 25 und 58 mit Cystein 111 oder 114 als auch der von Cystein 133 und 167 mit Cystein 226 oder 229. Es läßt sich schließlich ein Modell für die α2-Kette aufstellen, welches dem der α1-Kette (s. Abb.51) entspricht.

3.2.9.3. Quervernetzungen der dimeren α-Ketten der NC1-Domane

In Kapitel 3.2.2.1. ist in Abbildung 25 (S.59) die Auftrennung der hexameren NC1-Domane in die Monomere und Dimere gezeigt. Im Folgenden wird eine nähere Untersuchung der Dimeren beschrieben.

In Abbildung 53 ist die Chromatographie der Dimeren an einer C4 reversed phase HPLC Säule gezeigt. Das Elektropherogramm

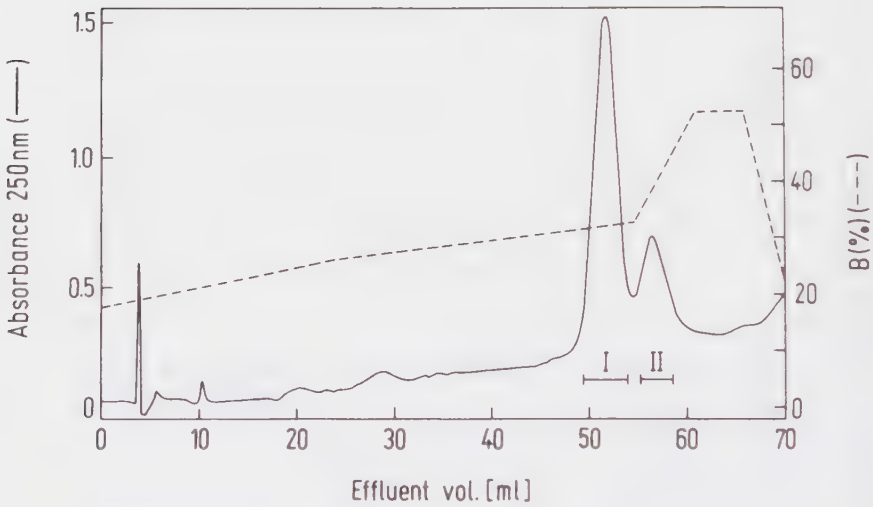


Abb.53 Chromatographie der dimeren NC1-α-Ketten an einer C4 reversed phase Säule.
Bedingungen:
Vydac TP-RP4 reversed phase HPLC Säule
linearer iso-Propanol/0.1% TFA Gradient.
Fraktion I enthält α1-Ketten.
Fraktion II enthält α1- und α2-Ketten im Verhältnis 1:1.

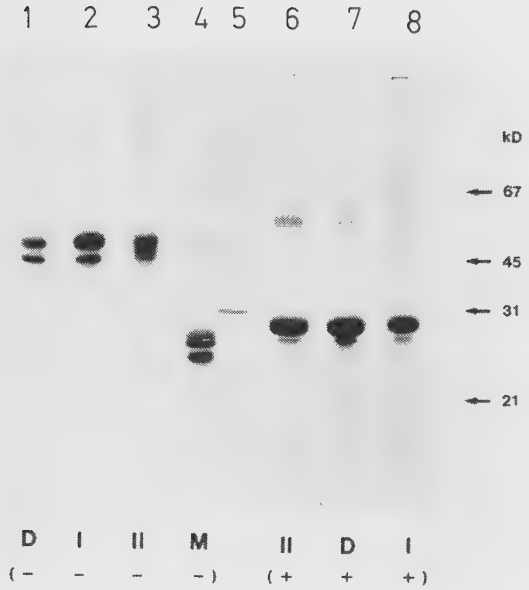


Abb.54 SDS-PAGE der Fraktionen I und II aus Abb.53 (Bestandteile der dimeren NC1-α-Ketten).
(+) reduziert, (-) nicht reduziert;
D = gesamte dimere Fraktion D;
I = Fraktion I, siehe Text;
II = Fraktion II, siehe Text;
M = gesamte monomere Fraktion M aus Abb.24, S.58.
Zum Vergleich sind in Spur 4 die Monomeren (M) der NC1-Domäne und in Spur 5 globuläre Proteine aufgetragen.

der dabei auftretenden Fraktionen ist in Abbildung 54 dargestellt. Fraktion I besteht trotz einer Auftrennung in zwei Banden (Abb.54, Spur 2) nach Sequenzierung nur aus NC1-α1-Ketten. Nach Reduktion und Carboxymethylierung bleibt nur noch eine Hauptbande (Abb.54, Spur 8), was damit ubereinstimmt, daß dieses Material bei Gelchromatographie an TSK Saulen in 4M Guanidiniumhydrochlorid nur eine Fraktion

zeigt, welche ein den Monomeren entsprechendes Elutionsvolumen besitzt (Abb.55a). Fraktion I beinhaltet demnach zwei über Disulfidbrücken zusammengehaltene α1-Ketten. Die Doppelbande in Abbildung 54, Spur 2 laßt sich moglicherweise durch unterschiedliche Verbruckung der Ketten und eine damit verbundene andere Faltung der Polypeptidketten erklaren.

Fraktion II enthält nach Sequenzanalyse NC1-α1- und NC1-α2-Ketten in einem Verhältnis von 1:1. Reduktion und Carboxymethylierung ergibt keine vollstandige Überfuhrung in Monomere (Abb.54, Spur 6), d.h. diese Fraktion enthält eine nicht reduzierbare Bindung. Dies wird auch sichtbar bei der Chromatographie dieses Materials an TSK Säulen in Abbildung 55b, wobei eine dimere Fraktion (A) und eine monomere Fraktion (B) auftreten. Nach Sequenzierung zeigt sich, daß Fraktion A nur NC1-α1- und Fraktion B nur NC1-α2-Ketten enthält. Das bedeutet, daß Fraktion II (Abb.53, S.108) ein Gemisch aus zwei verschiedenen Dimeren enthält; zum einen durch nicht reduzierbare Bindungen zusammengehaltene α1-Ketten und zum anderen durch Disulfidbrücken verknüpfte α2-Dimere.
Wie man aus Abbildung 53 ersieht, besitzen demnach die α2-Dimeren die gleiche Retentionszeit an einer C4 reversed phase Saule wie die α1-Dimeren mit einer nicht reduzierbaren Bindung, nämlich die der Fraktion II.

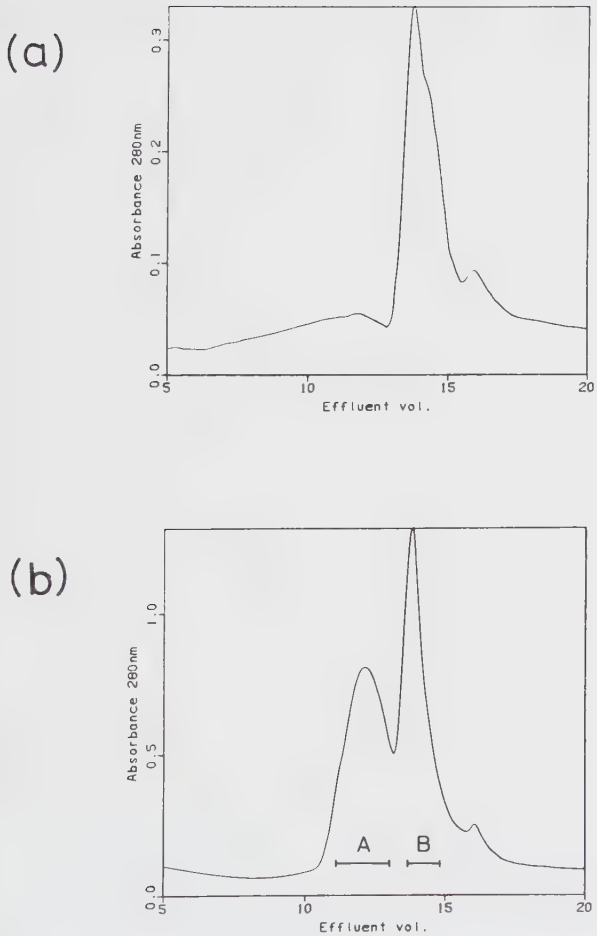
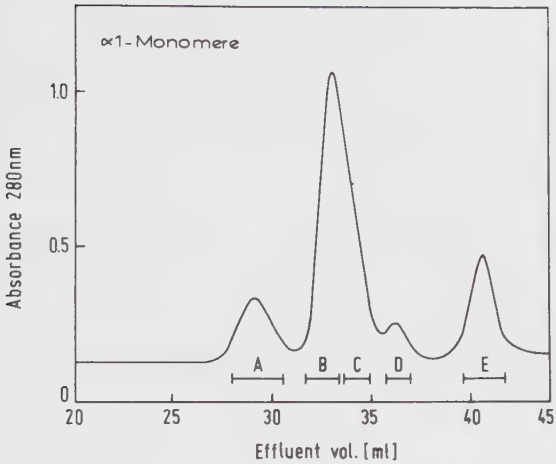


Abb.55 Chromatographie der dimeren Fraktion I (a) und II (b) aus Abb.53 nach Reduktion und Carboxymethylierung an einer TSK 3000 Gelfiltrationssäule, equilibriert in 4M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3.5. Die Fraktionen mit etwa 14 ml Elutionsvolumen entsprechen der Mobilität von monomeren NC1-α-Ketten. Der Peak bei etwa 12 ml Elutionsvolumen entspricht der Mobilität von dimeren NC1-α-Ketten. Fraktion A bzw. B der Abb.(b) enthalten α1- bzw. α2-Ketten. Der Peak der Abb.(a) enthält α1-Ketten.

3.2.9.4. Interketten Disulfidbrucken der α1-Dimere

Zur Untersuchung der interketten Disulfidbrucken wurden die NC1-α1-Dimeren der Fraktion I (s.Abb.53, S.108) verwendet. In der gleichen Weise wie bei der Lokalisierung der intraketten Disulfidbrucken beschrieben, wurden diese nicht reduziert mit BrCN gespalten. In Abbildung 56 ist das Profil der Chromatographie des BrCN-Peptidgemisches der α1-Dimere an zwei TSK Säulen in 4M Guanidiniumhydrochlorid im Vergleich zu der Chromatographie der α1-Monomere (vgl.Abb.46, S.99) dargestellt. Sie sind praktisch identisch. Man erkennt die gleichen funf Fraktionen A-E mit entsprechenden Elutionsvolumina. Geringe Verschiebungen der Elutionsvolumina der einzelnen Fraktionen zu großeren Werten konnen durch Alterung bedingte Anderung der Trenneigenschaften der TSK-Saulen erklart werden. Aus dem selben Grung waren wahrscheinlich auch die Fraktionen B und C besser voneinander getrennt als bei der Chromatographie des BrCN-Spaltgemisches der α1-Monomeren. Die Fraktionen B, C und E wurden mit einer C18 reversed phase HPLC Säule rechromatographiert und zeigten dabei ebenfalls analoge Profile zur Rechromatographie der Fraktionen B, C und E der nicht reduzierten monomeren α1-Ketten (Abb.47, S.100). Nach Sequenzierung zeigt sich, daß Fraktion B das Tripelpeptid CB4/CB5/CB6, Fraktion C das Doppelpeptid CB1/CB3 und Fraktion E CB2 enthalt. Eine Wiederholung der BrCN-Spaltung dieser α1-Dimeren ergab die gleichen Resultate.

Dieses vollig analoge Verhalten der interketten disulfidverknupften NC1-α1-Dimeren und der intraketten verknupften



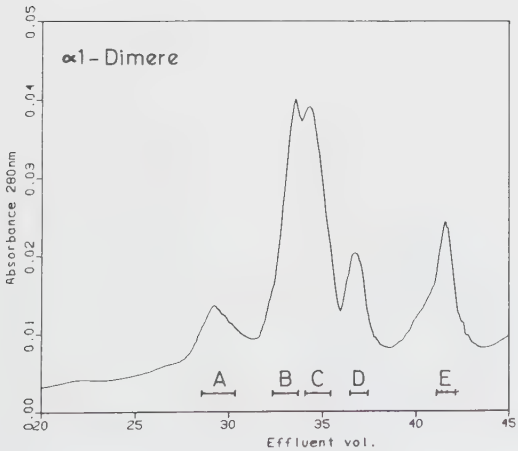


Abb.56 Chromatographie des BrCN-Peptidgemisches dimerer, über Disulfidbrücken verknüpfter NC1-α1-Ketten an zwei TSK 2000 Gelfiltrationssäulen;
Bedingungen wie in Abb.46, S.99.
Zum Vergleich ist die entsprechende Chromatographie der α1-Monomere aus Abb.46 abgebildet.

NC1-α1-Monomeren aus Kapitel 3.2.9.1. gegenuber einer BrCN-Spaltung im nicht reduzierten Zustand erubrigte eine Untersuchung der disulfidverbruckten BrCN-Peptide der α1-Dimeren nach ihrer Reduktion.

Die Interpretierung dieser Ergebnisse erlauben die Aufstellung eines Modells fur die Disulfidverbruckung der NC1-α1-Dimeren:

Diese Dimere werden über Disulfidbrucken zusammengehalten, die durch Cysteine aus den Einheiten A und A' (vgl. Kap. 3.2.8.), aus den Einheiten B und B' oder aus beiden Einheiten zweier α1-Ketten (α1 und α1') gebildet werden. Es

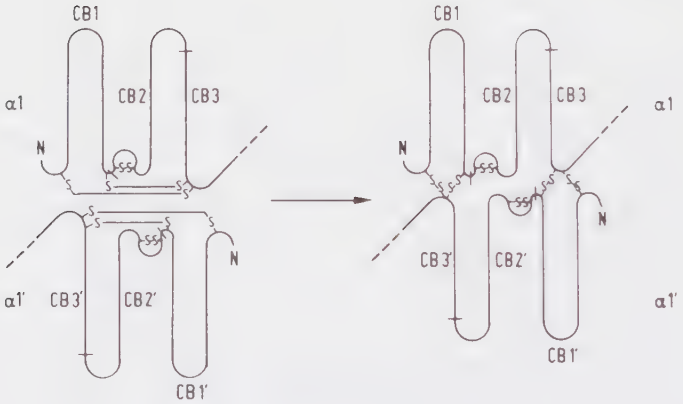


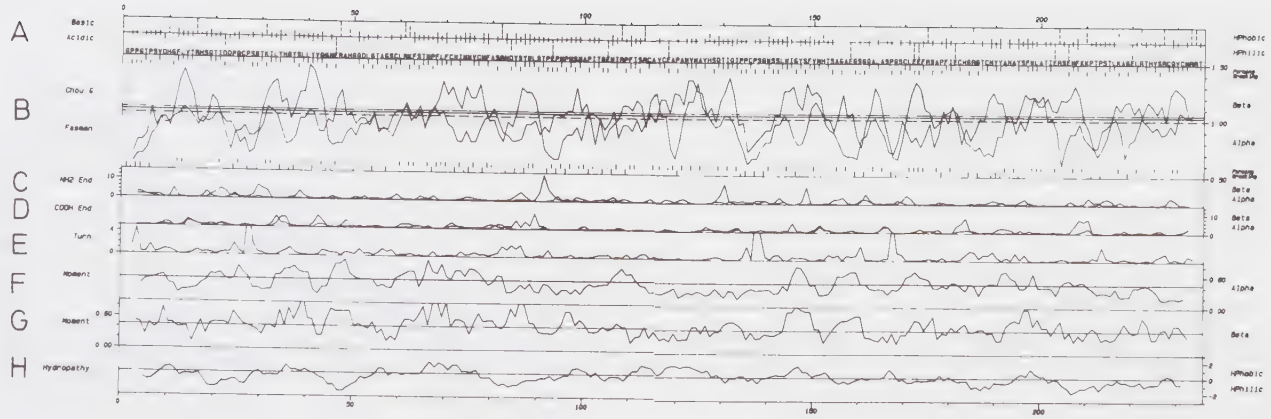
Abb.57 Modell für die Dimerisierung zweier Einheiten A aus zwei NC1-α1-Ketten (α1 und α1') durch Disulfidaustausch. Die Positionen der BrCN-Peptide CB1-CB3 und CB1'-CB3' sind eingezeichnet.
α1' = zweite α1-Kette

sind jedoch nur Brücken zwischen zwei gleichen Einheiten moglich, und außerdem kann der kleine Loop nicht an der Dimerisierung beteiligt sein. Es konnen daher nach einer BrCN-Spaltung folgende Peptide entstehen:
CB1/CB3' und CB1'/CB3 und/oder CB4/CB5/CB6' und CB4'/CB5'/CB6.
In Abbildung 57 ist eine Dimerisierung nach diesem Muster für zwei Einheiten A aus zwei α1-Ketten (α1 und α1') als Beispiel dargestellt.
Durch Disulfidaustausch von vier intraketten Disulfidbrücken zweier α1-Ketten können sich vier neue Brücken zwischen diesen α1-Ketten ausbilden und so zu interketten Disulfidbrücken werden.

3.2.10. Betrachtungen zur Sekundärstruktur der NC1-α-Ketten

In Abbildung 58 sind neben den Hydropathie Profilen (Feld H) weitere aus der Primarstruktur abgeleitete Charakteristika der beiden Polypeptidketten α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1 dargestellt. Das Feld A zeigt die Aminosäuresequenz und die Positionen der basischen, sauren, hydrophilen und hydrophoben Aminosauren. Die nächsten vier Felder (B, C, D und E) zeigen Ergebnisse verschiedener Berechnungen zur Vorhersage der Sekundärstruktur. Diese wurden nach der Methode von Chou und Fasman (88,89) auf Grund von Primarstruktur Daten berechnet. NH_2-End und COOH-End geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Folge von drei Aminosäureresten am N- oder C-terminalen Ende einer α-Helix

(1)


A
Basic
Acidic
B
Chou G
Fasman
C
NH2 End
D
COOH End
E
Turn
F
Moment
G
Moment
H
Hydropathy
Hydrophobic
Hydrophilic
Beta
Alpha

(2)

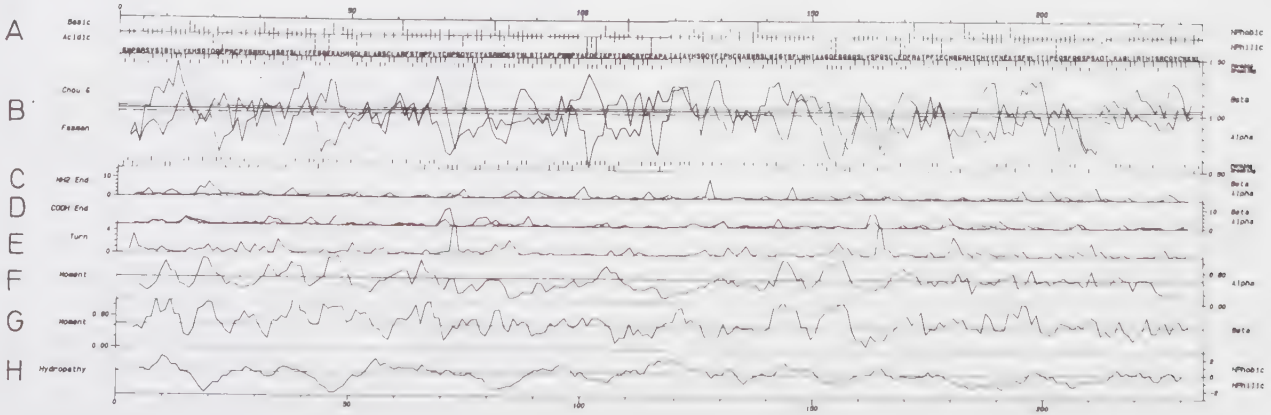

A
Basic
Acidic
B
Chou G
Fasman
C
NH2 End
D
COOH End
E
Turn
F
Moment
G
Moment
H
Hydropathy
Hydrophobic
Hydrophilic
Beta
Alpha

Abb.58 (vorige Seite) Graphische Darstellung der aus Primärstrukturdaten berechneten Sekundärstrukturvorhersagen von α1(IV)NC1 (1) und α2(IV)NC1 (2).
Feld A - Markierung der basischen, sauren, hydrophoben und hydrophilen Resten;
Feld B - Potentiale für die Ausbildung von α- bzw. β-Strukturen (nach Chou und Fasman);
Feld C und D - N- und C-terminale Begrenzung von Sekundärstruktur Bereichen;
Feld E - β-Turn Potential (nach Chou und Fasman);
Feld F und G - hydrophobes Moment der Aminosäurereste in α- und β-Strukturen;
Feld H - Hydropathie Profil.
Die Berechnungen und die Erstellung des Plots wurde mit dem Programm PEPPLOT (114) durchgeführt.

oder β-Faltblattstruktur vorkommen. Peaks dieser Graphen begrenzen Sekundärstruktur Bereiche. Feld F und G geben die hydrophoben Momente für α-Helix und β-Faltblatt in Form eines Graphen an. Mit Hilfe dieser und der Hydropathie Werte läßt sich eine Aussage über die Orientierung einer Sekundärstruktur machen. Sekundärstrukturen mit Werten des hydrophoben Momentes, die größer als 0.45 sind, weisen auf eine dem Lösungsmittel zugewandte Seite an der Oberfläche des Proteins hin, während niedrigere Werte als 0.45 für Sekundärstrukturen im Innern des Proteins charakteristisch sind (entsprechend Eisenberg et.al., 90).
Im allgemeinen lassen sich für die α1- und α2-Kette der NC1-Domäne keine dominanten Sekundärstruktur Bereiche bestimmen. Nach den berechneten Vorhersagen gibt es einige kurze Sequenzen von 5-15 Aminosäuren mit β-Faltblatt oder α-Helix Struktur, wobei Faltblattstrukturen an Zahl überwiegen, und einige Bereiche mit deutlichen Turns.
Interessant sind die Sekundärstruktur Daten für die Bereiche um die Cysteine; in Tabelle 9 sind sie aufgelistet. Die Cysteinpaare 182 und 188 (α1-Kette), 70 und 76 sowie 179

Cystein Position	vorhergesagte Sek.struktur	Lage der Sekundarstr.	Hydropathie
α1-Kette			
26	Turn	----	-
59	----	----	+-
71	Faltblatt	Oberflache	+
77	Faltblatt	Oberflache	+-
114	----	Innenseite	+
117	α-Helix	Innenseite	+
136	Turn	----	+-
170	Turn	----	+-
182	----	----	-
188	(Faltblatt)	----	+-
228	(Faltblatt)	----	+-
231	Faltblatt	----	+-
α2-Kette			
25	(Turn)	----	+-
58	----	----	+
70	Faltblatt	Oberfläche	+
76	Faltblatt	Oberfläche	+
111	----	Innenseite	+
114	(α-Helix)	Innenseite	+
133	(Turn)	----	+
167	Turn	----	+-
179	(Faltblatt)	Oberfläche	-
186	(Faltblatt)	(Oberfläche)	-
227	(Faltblatt)	----	+-
230	Faltblatt	----	+-

Tab.9 Sekundärstrukturbereiche in der Umgebung der 12 Cysteine von α1(IV)NC1 und α2(IV)NC1, ermittelt aus Abb.58 und mit Berechnungen einer erweiterten Chou-Fasman-Methode (89).
+ = hydrophob;
- = hydrophil;
+- = neutral;
() = unsicher;
---- = keine Aussage möglich;

und 186 (α2-Kette), welche die kleinen Loops bilden, begrenzen jeweils beidseitig einen Bereich mit erhöhtem Turnpotential. Dies bestarkt die Annahme, daß diese Cystein-Paare durch Disulfidbrucken Loops bilden. In Analogie zu diesen drei Loops sollte man aus Homologiegrunden fur die

Cysteine der Positionen 71 und 77 eine ähnliche Struktur vorhersagen konnen, obwohl mit der Chou-Fasman-Methode dort kein erhohtes Turnpotential berechnet wurde. Allen diesen vier Bereichen, vor allem aber den Positionen 71 und 77 (α1-Kette) sowie 70 und 76 (α2-Kette), ist gemeinsam, daß diese Cysteine in vorhergesagten, von Turns unterbrochenen β-Faltblatt Strukturen liegen. Eine weitere Gemeinsamkeit läßt sich bei Betrachtung der Werte des hydrophoben Moments und der Hydropatie erkennen. Die Faltblattstruktur der Cysteine 71 und 77 (α1-Kette) bzw. 70 und 76 (α2-Kette) haben ein erhöhtes hydrophobes Moment und sind schwach hydrophob, die der Cysteine 180 und 188 (α1-Kette) bzw. 179 und 186 (α2-Kette) besitzen ebenfalls ein erhöhtes hydrophobes Moment, sind jedoch hydrophil. Da die hydrophoben Momente beider Faltblattbereiche, d.h. dieser Loops, größer als 0.45 sind, sollten sie an der Oberfläche des Proteins liegen.

Die Disulfidknoten, die jeweils das N- und das C-terminale Ende einer A oder B Einheit zusammenschließen und die aus den Cysteinen 26,59,114 und 117 bzw. 136,170,228 und 231 der α1-Kette und den entsprechenden Cysteinen der α2-Kette (25, 58, 111, 114 und 133, 167, 227, 231) gebildet werden, zeigen nach den Berechnungen eine einheitliche Struktur. Man findet für die Cysteine 26, 136 und 170, (α1-Kette) bzw. für das Cystein 167 (α2-Kette), daß sie in direkter Nachbarschaft erhöhter Turnpotentiale auftreten. Für die Cysteine in den Positionen 25 und 133 (α2-Kette) gilt entsprechendes, obwohl die Potentiale der Turns in der Nachbarschaft nicht so hoch sind. Jedoch kann man aus den homologen Positionen

und Bereichen um die Cysteine wahrscheinlich mit Analogie rechnen. Die vier Bereiche von Cysteinen, die zwei Aminosauren auseinanderliegen (Pos.114,117,228,231 bzw. 111,114,227,230) und nach den Daten aus Kapitel 3.2.9.2. mit den eben besprochenen Cysteinen Disulfidbrucken bilden, liegen nach den Vorhersagen in β-Faltblatt oder α-Helix Strukturen. Die Cysteine 114 und 117 (α1-Kette) bzw. 111 und 114 (α2-Kette) liegen am N-terminalen Ende einer α-Helix, und die zugehorigen Werte des hydrophoben Momentes und der Hydropathie weisen daraufhin, daß dieser Bereich im Innern des Proteins liegt. Die Bereiche der Cysteine 228 und 231 (α1-Kette) sowie 227 und 230 (α2-Kette) ergeben erhohte β-Faltblattpotentiale, von welchen jedoch nicht gesagt werden kann, ob sie an der Oberflache oder im Innern des Proteins liegen.

Die einheitlichen Strukturen bestehen also aus einer α-Helix oder einem β-Faltblatt, welche uber Disulfidbrucken mit zwei Turns verbunden sind und wahrscheinlich im Innern der gefalteten Polypeptidkette liegen.

4. Diskussion

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit behandelt die Aufklärung der Primär- und Sekundärstruktur der 7s-Domäne. Diese Domäne bezeichnet den 30nm langen, N-terminalen Bereich des Typ IV Kollagens, welcher mit drei weiteren Typ IV N-Termini zum sogenannten 7s-Kollagen uberlappt. Zu seiner Isolierung wurde das Typ IV Kollagen in tetramerer Form durch limitierte Pepsinbehandlung aus menschlicher Plazenta extrahiert und mit Kollagenase behandelt. Dabei erhält man das 7s-Kollagen in langer Form. Bei einer intensiven Behandlung mit Trypsin entsteht das 7s-Kollagen in kurzer Form. Die extrem gewählten Isolierbedingungen greifen nur den zentralen tripelhelikalen Teil des Typ IV Kollagens an, während das 7sS-Kollagen, welches durch Quervernetzungen sehr resistent gegen Proteasen ist, vollständig erhalten bleibt.

Nach intensiver Reduktion und Carboxymethylierung zerfällt das 7s-Kollagen nicht vollständig in seine monomeren Untereinheiten, sondern es bleiben auch dimere, trimere usw. bis dodekamere α-Ketten zurück, die durch nicht reduzierbare Quervernetzungen zusammengehalten werden. Die monomere Fraktion wurde in die $\alpha 1$- und in die $\alpha 2$-Kette aufgetrennt. Das hierbei erhaltene Mengenverhältnis der beiden α-Ketten zueinander entspricht etwa der Kettenzusammensetzung des Typ IV Kollagens ($(\alpha 1)_2 \alpha 2$).

Ausgehend von schon bekannten Sequenzdaten wurden die 216

Aminosaurereste der α1-Kette und 211 Aminosaurereste der α2-Kette vervollstandigt. Dies erfolgte durch Sequenzierung von Peptiden, die aus Spaltungen mit BrCN und Behandlung mit Trypsin und S. aureus V8 Protease erhalten wurden.

Bei einer Betrachtung der Primarstruktur erkennt man, daß das Maß der posttranslationalen Modifikationen der Prolin und Lysinreste im Bereich der 7s α-Ketten dem der zentralen Tripelhelix entspricht. Wie im gesamten bisher sequenzierten Typ IV Kollagen sind alle Lysine in Position Yaa hydroxyliert und glykosyliert.

Die Cysteine in Position 98 bzw. 101 (vgl. Abb.15, S.35 bzw. Abb.19, S.41) der Tripelhelix sind jeweils benachbart von Asparagin, an welchem ein biantennares Heteropolysaccharid vom Mannose reichen Typ gebunden ist. Dies ist der erste und bisher einzige bekannte Fall eines N-glykosidisch gebundenen Heteropolysaccharids in einer Kollagen Tripelhelix.

Betrachtet man die Sequenz der beiden α-Ketten, so erkennt man deutlich verwandte Bereiche (Abb.59).
Die 24 N-terminalen Aminosauren der beiden tryptisch hergestellten α-Ketten der 7s-Domane bilden einen nicht tripelhelikalen Quervernetzungsbereich. An ihn anschließend folgt eine Tripelhelix mit Quervernetzungsstelle, welche von einem kurzen, nicht tripelhelikalen Abschnitt unterbrochen ist. Der entsprechende Bereich der α1-Kette ist 13 Aminosauren (Position 133-145) und der der α2-Kette ist 12 Aminosauren lang (Position 136-147). Dieser Sequenzabschnitt ist verantwortlich für einen flexiblen Bereich der

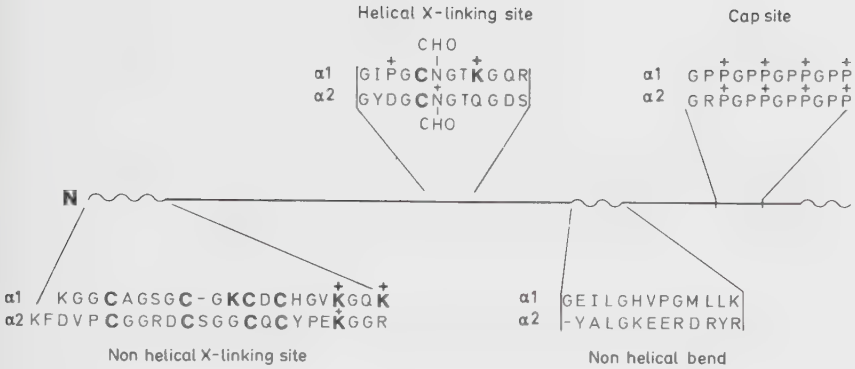


Abb.59 Schematische Darstellung homologer Bereiche der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur von α1(IV)7s und α2(IV)7s. Vier Ausschnitte der Sequenz sind hervorgehoben:
-nicht tripelhelikaler, quervernetzender N-Terminus
-Quervernetzungsbereich der Haupttripelhelix
-Unterbrechung der Tripelhelix
-Tripelhelix, reich an Prolin und Hydroxyprolin

+ = hydroxylierte Proline bzw. Lysine;

Tripelhelix. In früheren Arbeiten (92) wurde aus elektronenmikroskopischen Daten ein flexibler Bereich der Typ IV Tripelhelix anschließend an das 7s-Kollagen festgestellt. Diese Tatsache konnte nun mit den Primärstrukturdaten erklärt werden. Interessant ist, daß die nicht tripelhelikale Sequenz der α2-Kette um eine Aminosaure kürzer ist als die der α1-Kette. Dies könnte der Grund dafür

sein, daß die Arme des 7s-Kollagens mit einem Winkel von 40° vom Überlappungsbereich abstehen. Diese Arme werden aus einer Tripelhelix gebildet, welche einen Prolin und Hydroxyprolin reichen Bereich beinhaltet. Solch eine hohe Dichte an Gly-Pro-Hyp Tripletts verleiht der Tripelhelix eine erhohte Stabilität, welche die im Vergleich zu den fibrillenbildenden Kollagenen relativ hohe Denaturierungstemperatur von 47°C für die Arme des 7s-Kollagens in langer Form erklärt.

Die proteinchemische Bestimmung der Sequenz des 7s-Kollagens in langer Form endet schließlich mit den Positionen 216 und 211. Die letzten neun Aminosäuren der α1-Kette waren nicht ganz sicher und konnten durch aus cDNA abgeleiteten Sequenzen korrigiert werden (D.Brazel, personl. Mitteilung). Nach diesen Daten folgt an das 7s-Kollagen ein erneuter kurzer, nicht tripelhelikaler Abschnitt, früher als NC2-Domane bezeichnet, welcher eine Hauptspaltstelle des Molekuls für Pepsin enthält und für die Entstehung des 7sL-Kollagens verantwortlich ist. Die Sequenz der α2-Kette ist an dieser Stelle noch nicht bekannt. Es ist aber anzunehmen, daß sie auch dort homolog zur α1-Kette verlauft.

Die durch intensive Trypsinbehandlung hergestellte Kurzform des 7s-Kollagens entsteht bei der α1-Kette durch Spaltung am Arginin in Position 148. Dies konnte durch die Isolierung und Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des C-terminalen 6er Peptids (Position 143-148) aus der BrCN-Spaltung von α1(IV)7sS ermittelt werden. Die

entsprechende Trypsinspaltstelle liegt bei der α2-Kette wahrscheinlich bei einem der Arginine in Position 145 oder 147.

Nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen des 7s-Kollagens überlappen vier Typ IV Kollagenmoleküle 30nm mit ihren N-terminalen 7s-Domänen. Diese Anordnung sollte die Möglichkeit zur Bildung von intermolekularen Quervernetzungen dieser N-Termini bieten. Die Sequenzen der beiden α-Ketten der 7s-Domäne beinhalten Aminosäuren mit potentiellen Quervernetzungsfunktionen. So besitzen beide Ketten in ihren N-terminalen, nicht tripelhelikalen Abschnitten 4 Cysteine und einige Lysine bzw. Hydroxylysine (Abb.59), außerdem in der sich anschließenden Tripelhelix ein Cystein und in der α1-Kette zusätzlich ein Hydroxylysin. Mit diesen Aminosäuren ist sowohl eine parallele als auch eine antiparallele Fixierung zweier α-Ketten durch kovalente Bindungen theoretisch möglich.
Mit Interaktionsanalysen, zunächst eindimensional, konnte die Orientierung der Ketten zueinander so festgelegt werden, daß Bereiche mit erhöhter Hydrophobizität bei antiparalleler Anordnung optimal überlappten, wenn - die linear gestreckte Sequenz vorausgesetzt - das letzte Cystein im nicht tripelhelikalen Abschnitt und das Cystein im tripelhelikalen Bereich miteinander reagieren können. Das bedeutet in dieser eindimensionalen Betrachtung, daß eine Aggregation der Ketten mit sich selbst allein durch hydrophobe Wechselwirkungen möglich ist und sie dabei so positioniert werden, daß eine Bildung von Disulfidbrücken begünstigt ist. Die an den

N-Termini jeder Kette ubrigbleibenden drei Cysteine konnen zusatzliche inter- und intramolekulare Disulfidbrucken ausbilden. Bei der beschriebenen Fixierung zweier antiparalleler α1-Ketten durch die beiden Cysteine kommt außerdem hinzu, daß auch Lysin in Position 11 und Hydroxylysin in Position 102 einander gegenuberstehen und somit die Bildung einer weiteren kovalenten Bindung moglich ist (Abb.60). Da bei der α2-Kette in dem entsprechenden tripelhelikalen Bereich weder ein Lysin noch ein Hydroxylysin vorliegt, ist eine kovalente Verknupfung zweier

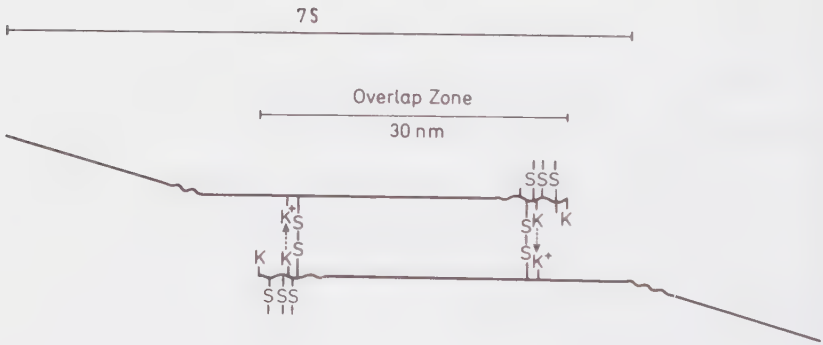


Abb.60 Schematische Darstellung zweier antiparalleler α1-Ketten und deren mogliche Verbrückung durch Cystein in Position 14 und 98 als auch durch Lysin in Position 11 und Hydroxylysin in Position 102 nach Aggregation durch Überlappung der hydrophoben Bereiche der Ketten.

antiparalleler α2- oder einer α1- mit einer α2-Kette über solche Quervernetzungen nicht möglich.

Die dreidimensionale Berechnung, durchgeführt von Herrn H. Hofmann, berücksichtigte mehrere Parameter. Sie ergab für die axiale Anordnung im Prinzip das gleiche Ergebnis wie bei der eindimensionalen Analyse und ließ zusätzliche Schlußfolgerungen für die laterale Anordnung der Moleküle zu.
Beim Vergleich verschiedener α-Ketten-Reihenfolgen der Tripelhelizes und verschiedener Ganghöhen der Tripelhelizes fand man die wahrscheinlichste Anordnung mit der besten hydrophoben Interaktion für die Kettenreihenfolge α2-α1-α1. Die Disulfidbrücken sind hierbei nicht ganz so eindeutig festgelegt wie im Falle der eindimensionalen Anordnung. Dies liegt daran, daß ein N-terminales Cystein (Position 14 oder 17 der α1- oder α2-Kette) mit einem der drei helikalen Cysteine in Position 98 bzw. 101 der drei Ketten reagieren kann. Diese Cysteine liegen, bedingt durch den versetzten Aufbau einer Tripelhelix, nebeneinander und nicht genau an einer Position. Hierdurch entsteht eine Variabilität der Orientierung der Tripelhelizes zueinander von drei Positionen.
Für die azimutale Anordnung der Molekule konnte ebenfalls kein absolut eindeutiges Resultat erzielt werden. Am wahrscheinlichsten war eine relativ breite selbstinteragierende Reaktionskannte von etwa Π/2 fur zwei antiparallele Typ IV Kollagen N-Termini. Das heißt, daß die azimutale Orientierung zweier Tripelhelizes zueinander in einem relativ großen Bereich variiert werden kann, ohne an

Intensitat der hydrophoben Interaktionen zu verlieren.

Interessant ist, daß sowohl die eindimensionale als auch die dreidimensionale Analyse fur ein paralleles Alignment kein markantes Interaktionsmaximum ergab. Das liegt zum Teil daran, daß bei einer parallelen Anlagerung gleichsinnig geladene Aminosaurereste einander gegenuber zu liegen kommen und dadurch eine Aggregation destabilisiert wurde. Es wird daher auf jeden Fall eine antiparallele Assoziation der Typ IV Kollagen N-Termini bevorzugt sein.

Der Aufbau des aus vier Typ IV N-Termini bestehenden 7s-Kollagens kann folgendermaßen konstruiert werden:

Zwei monomere Typ IV Kollagenmoleküle bilden durch Aggregation uber ihre N-Termini antiparallele Dimere. Dies wird durch Assoziation ihrer hydrophoben Reaktionskannten verursacht. Solch ein antiparalleles Dimeres aggregiert nun durch hydrophobe Interaktionen mit einem weiteren antiparallelen Dimeren. Dabei müssen sich die vier beteiligten Tripelhelizes etwa um $\Pi/4$ um ihre eigene Achse drehen, sodaß alle vier Reaktionskanten auf ein den vier Tripelhelizes gemeinsames Zentrum zuweisen (Abb.61). Die Reaktionskannten der vier N-Termini begrenzen nun einen "Reaktionsraum", der einen hydrophoben Kafig im Innern des Moleküls darstellt.

Diese Darstellung der Selbstaggregation der Typ IV Kollagen N-Termini stimmt damit überein, daß Bachinger et.al. (93) aus Zellkultur nur Typ IV Kollagenmolekule isolieren konnte, welche als Dimere antiparallel oder als Tetramere uber ihre N-Termini aggregiert sind. Sie konnten keine

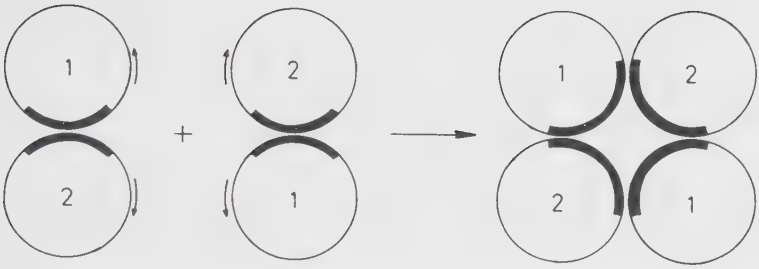


Abb.61 Schematische Darstellung der Aggregation zweier über ihre N-Termini antiparallel verknüpfter Typ IV Kollagen Dimere. Es bildet sich ein "hydrophober Käfig" im Innern der vier assoziierten N-Termini.

Dimere zwischen zwei parallel angeordneten Molekülen beobachten. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen von Oberbäumer et.al. (43). Auch bei in vitro Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß monomere Kollagenmoleküle in Abhängigkeit von Temperatur, Konzentration, pH und Zeit zu Tetrameren aggregierten, die teilweise über Disulfidbrücken verknüpft waren (92).

Die Interaktionsanalysen und diese experimentellen Daten machen deutlich, daß alleine die Struktur der N-terminalen Enden der Typ IV Kollagenmoleküle für ihre Selbstaggregation

verantwortlich ist.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des in nativem Zustand reduzierten 7sL-Kollagens lieferte zusatzliche Informationen uber die intermolekularen, nicht reduzierbaren, Lysin abgeleiteten Bindungen. Diese Aufnahmen zeigten, daß die antiparallel angeordneten Molekule zwischen Allysin oder Hydroxyallysin im nicht helikalen Bereich und Hydroxylysin im helikalen Quervernetzungsabschnitt maximal verknupft sind. In veringertem Maß tritt eine Bindung zwischen nicht helikalen Bereichen von parallel gelagerten Molekülen auf.
Mit diesem Resultat stimmt uberein, daß bei Elektrophorese des unter denaturierenden Bedingungen vollstandig reduzierten 7s-Kollagens die Banden der dimeren bis hexameren Ketten sehr viel intensiver sind als die Banden der heptameren bis dodekameren Ketten. Dies zeigt, daß die nicht reduzierbaren Quervernetzungen hauptsachlich innerhalb dimerer Tripelhelizes und nur wenige zwischen zwei Dimeren auftreten. Ware die Ausbildung der nicht reduzierbaren Quervernetzungen innerhalb der Tetramere rein statistisch, so sollten bei der Elektrophorese zwolf gleich starke Banden erscheinen.

Die Anordnung der 7s-Domanen und die Ausbildung der Lysinquervernetzungen zeigen gewisse Ahnlichkeiten zu den ebenfalls 30nm langen Quervernetzungsendbereichen der fibrillenbildenden Kollagene (s. Abb.2, S.6), mit denen die Molekule N- und C-terminal parallel uberlappen. Auch hier

treten nicht helikale Bereiche mit oxidierbaren Lysinresten und ein helikaler Quervernetzungsbereich auf. Es zeigte sich aber außer einem gemeinsamen Prolin und Hydroxyprolin reichen C-terminalen Abschnitt keine wirkliche Sequenzhomologie. Weitergehende Sequenzvergleiche ergaben aber uberraschender Weise gewisse Ahnlichkeiten der 7s-Domane zu den tripelhelikalen Bereichen der Aminopropeptide dieser fibrillenbildenden Kollagene, welche ihrerseits dagegen keine Homologie zu den zentralen Tripelhelizes zeigen.
Diese Ahnlichkeit laßt sich bei einem Vergleich der Funktionen des 7s und den bis heute bekannten Funktionen der Aminopropeptide nicht erklären.

Der zweite Teil dieser Arbeit behandelt die Aufklärung der Primar- und teilweise der Sekundärstruktur der NC1-Domane des Typ IV Kollagens. Die am C-Terminus gelegene NC1-Domane stellt einen nicht kollagenen Abschnitt des Typ IV Kollagens dar, welcher neben dem 7s-Kollagen fur die Ausbildung des Netzwerkes durch Vernetzung zweier Typ IV Kollagenmolekule verantwortlich ist. Die NC1-Domäne konnte als Hexameres durch zweimalige Kollagenasebehandlung aus menschlicher Plazenta isoliert werden und ist aus monomeren und intermolekularen, dimeren NC1-α-Ketten aufgebaut. Die bisher bestandenen Probleme der Trennung dieser monomeren und dimeren α-Ketten konnte unter Ausnutzung der Tatsache, daß die NC1-Domane bei sauren pH-Werten in seine Untereinheiten dissoziiert, durch Verwendung eines entsprechenden Puffers gelost werden. Die Trennung der Monomere in NC1-α1- und

NC1-α2-Ketten gelang mit reversed phase HPLC, wobei die beiden Ketten etwa in gleichen molaren Mengen anfielen.

Die Trennung der zur Sequenzierung benotigten Peptide aus BrCN-, o-JBS- und Trypsinspaltungen war durch deren hohe Aggregationstendenz außerst schwierig und bedeutete einen sehr hohen Zeitaufwand. Dennoch konnten durch N-terminale Sequenzanalyse gereinigter Peptide fur die α1-Kette 76% und fur die α2-Kette 93% der Primarstruktur aufgeklart werden. Inzwischen waren die aus Maus- (83) bzw. Human-cDNA Klonen (80,81) abgeleiteten Sequenzen der α1- bzw. α2-Kette bekannt, womit die fehlenden 24% bzw. 7% der Primarstruktur abgedeckt werden konnten, und es erübrigte sich die vollstandige Aufklarung der Sequenzen durch uberlappende Peptide.

Die Frage, ob auch beim Typ IV Kollagen wie bei den fibrillenbildenden Kollagenen eine Proform mit abspaltbaren C-terminalen Propeptiden vorhanden ist, ist zu verneinen. Durch die Bestimmung des C-Terminus der beiden NC1 α-Ketten mit Carboxypeptidase P konnte gezeigt werden, daß das C-terminale Ende der Proteinsequenz mit der aus Maus- bzw. Human-cDNA abgeleiteten, translatierten Sequenz identisch ist. Der Größenunterschied von 2kDa, der von Timpl et.al. (94) für die aus Zellkultur isolierte NC1-Domane im Vergleich zu der aus extrazellularer Matrix extrahierten NC1-Domane festgestellt wurde, kann daher nicht von einer Prozessierung am C-Terminus der α-Ketten herrühren. Evtl. unterscheiden sich die beiden Domanen durch unterschiedliche

oder noch nicht voll ausgebildete Disulfidbrücken, was zu einer scheinbaren Vergrößerung eines Proteins führen kann.

Homologieanalysen an den NC1-α-Ketten förderten zwei sehr interessante Verwandschaften zu Tage. Zum einen werden beide Ketten aus zwei stark verwandten Einheiten aufgebaut, in denen fast 40% der Aminosäuren identisch sind und welche durch die identischen Positionen der Cysteine wahrscheinlich eine ähnliche räumliche Struktur ausbilden. Zum anderen findet man eine sehr hohe Verwandtschaft zwischen der α1- und der α2-Kette, welche sich in mehr als 60% identischen Aminosäuren zeigt. Diese hohe intra- und interketten Verwandtschaft läßt den Schluß zu, daß sowohl die α1- als auch die α2-Kette aus derselben Geneinheit durch Genduplikation und "Crossing Over" entstanden sind. Dies steht damit in Kontrast, daß zwischen der α1- und der α2-Kette der zentralen Tripelhelix des Typ IV Kollagens nur eine wenig signifikante Homologie festgestellt wurde (95). Die Ursache hierfür ist mit Sicherheit darin zu suchen, daß die durch Genduplikation entstandenen NC1-α-Ketten mit ihrer genau definierten Funktion in der Evolution einem sehr viel höheren Selektionsdruck unterworfen sind als die tripelhelikalen Bereiche der α-Ketten.

Die Lokalisierung von Disulfidbrücken zwischen BrCN-Peptiden der monomeren NC1-α1-Kette führte zu dem in Abbildung 51 (s.S.105) gezeigten Modell der intraketten Disulfidverbrukkung, welches auch für die α2-Kette Gültigkeit hat.
Die Art der Verbrückung der 6 Cysteine jeder Untereinheit,

wie sie vergleichbar auch in dimeren NC1-α1-Ketten vorliegt (s.Abb.57, S.114), bewirkt zum einen eine Konzentrierung von zwei Disulfidbrucken (z.B. Cystein Pos. 26, 59, 114 und 117 der α1-Kette) in einem kleinen Bereich, was die Polypeptidkette zur Bildung von zwei großen Loops A und B mit 32 bzw.

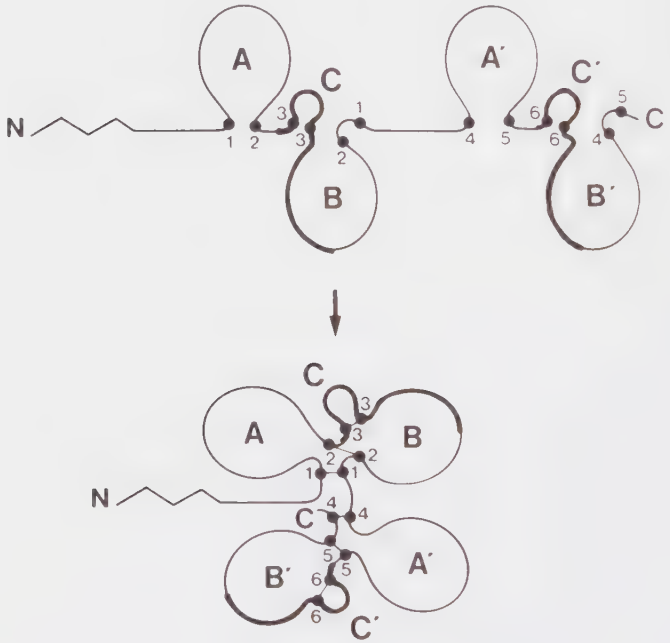


Abb.62 Schematische Darstellung der intramolekularen Disulfidverbrückung einer NC1-α-Kette.
Man erkennt die homologe Positionierung der Cysteine in den beiden Kettenhälften. Mit gleichen Ziffern bezeichnete Cysteine bilden Disulfidbrucken. Diese zwingen die Polypeptidkette zur Bildung der Loops A, B und C.
dicke Linien: zu den Carboxyprokollagenen der Typen I-III homologe Bereiche von 32 Aminosäuren.

36 Aminosauren zwingt. Wie man in Abbildung 62 erkennt, tritt dieser "Disulfidknoten" in beiden Untereinheiten beider Ketten auf. Zum anderen bilden die restlichen beiden Cysteine (z.B. Pos. 71 und 77 der α1-Kette) durch ihre Verbrückung die kleinen Loops C mit 5 Aminosäuren.

Die Berechnung der Sekundärstruktur im Bereich der Cysteine ergibt ein vernünftiges Bild. So zeigt sich, daß die beiden den Loop C bildenden Cysteinreste einen Turn einschließen und dieser Loop unter Berücksichtigung der hydrophoben Momente an der Oberfläche der gefalteten Polypeptidkette liegen sollte. Fur die Disulfidknoten der Untereinheiten beider Ketten läßt sich mit Blick auf die Sekundärstruktur-vorhersagen sowie die hydrophoben Momente und die Hydropathiewerte ein gemeinsames Strukturelement spekulieren. Danach sind die beiden im Abstand von drei Aminosauren auseinanderliegenden Cysteine (z.B. Pos. 114 und 117 der α1-Kette) in einer starren β-Faltblatt- oder α-Helix-Struktur eingebettet, welche im Innern der gefalteten Polypeptidketten liegen sollte. Sie sind über zwei Disulfidbrücken mit in Turns liegenden Cysteinen (z.B. Pos. 26 bzw. 59 der α1-Kette) verbunden. Trotz den hohen Fehlerquoten, mit denen die Chou-Fasman Methode behaftet ist, scheint diese Vorhersage vernünftig zu sein. Denn dieses Strukturelement stellt eine Möglichkeit dar, drei Kettenteile auf solch engem Raum über Disulfidbrücken miteinander zu verknüpfen.

Es stellte sich heraus, daß gerade ein Bereich von 32

Aminosauren um die Loops C zu einem Ausschnitt von 32 Aminosauren der Carboxyprokollagene der Typen I, II und III homolog ist (vgl. Abb.62 bzw. Abb.45, S.96), welcher zudem in diesen Carboxyprokollagenen einen sehr stark konservierten Abschnitt reprasentiert (86). Die Carboxypropeptide der fibrillenbildenden Kollagene aggregieren nach ihrer Synthese miteinander, um die drei α-Ketten auszurichten und die Ausbildung der Tripelhelix zu ermöglichen. Vor der Fibrillenbildung werden sie abgespalten. Die NC1-Domane hat wahrscheinlich für die Zusammenlagerung der α1(IV)- und α2(IV)-Ketten vor der Tripelhelixbildung eine ähnliche Funktion, sie wird jedoch anschließend nicht von der Tripelhelix abgetrennt. Aus der Ähnlichkeit dieser Bereiche um die Loops C der NC1 α-Ketten mit den Carboxypropeptiden konnte man schließen, daß die Umgebung dieser Loops oder die Loops selbst fur die Aggregation der α-Ketten verantwortlich sind. Außerdem wäre ihre Lage an der Oberfläche der gefalteten Polypeptidkette für diese Aggregation der α-Ketten von Vorteil.

Die Charakterisierung der durch intermolekulare Disulfidbrücken entstandenen Dimere der NC1-α-Ketten ergab vorwiegend Bindungen zwischen zwei α1-Ketten und nur wenige zwischen zwei α2-Ketten. Quervernetzungen zwischen α1- und α2-Ketten konnten nicht beobachtet werden. Außerdem ist ein kleiner Teil der α1-Dimere zusätzlich über nicht reduzierbare Quervernetzungen verbruckt. Die durchschnittlichen Mengenverhaltnisse der NC1-Zusammensetzung aus

hexameres NC1 (100%)	
3 monomere α-Ketten (50%)	3 dimere α-Ketten (50%)
1.5 monomere α1-Ketten (25%) 1.5 monomere α2-Ketten (25%)	1.1 α1 - Dimere (38%) 0.2 α2 - Dimere (6%) 0.2 α1*-Dimere (6%)

Tab.10 Durchschnittliche Zusammensetzung der hexameren NC1-Domäne aus monomeren und dimeren α-Ketten. Angaben in Anzahl Moleküle und Prozent.
* = Dimere, welche eine nicht reduzierbare Quervernetzung enthalten.

monomeren und dimeren α-Ketten, welche in Tabelle 10 angegeben sind, entsprechen nicht dem Ergebnis einer rein statistischen Betrachtung der Kombinationsmöglichkeiten der α-Ketten. Daher muß man annehmen, daß die Dimerisierung zweier NC1-Domänen in einer bestimmten, gezielten Orientierung der Ketten zueinander vor sich geht.

Als eine weitere wichtige Funktion ist die NC1-Domäne verantwortlich fur die C-terminale End-zu-End Aggregation zweier Typ IV Kollagenmoleküle und deren nachfolgende Verfestigung durch Disulfidbrücken.
Ist die Vorhersage für die Lage der für die Dimerisierung alleine verantwortlichen Disulfidknoten im Innern der gefalteten α-Kettenhälften A bzw. B richtig, so sollte bei der Assoziation von NC1-Domanen zweier Typ IV Kollagenmolekule eine Konformationsänderung stattfinden, und zwar so,

daß zwei innenliegende, intraketten Disulfidknoten zweier interaggierender α-Ketten nahe zueinander zu liegen kommen, wodurch ein Disulfidaustausch begunstigt wird. Diese Konformationsanderung konnte einerseits einen Energiegewinn mit sich bringen, verursacht durch Wechselwirkungsenergien von sich beruhrenden Aminosaureresten, andererseits konnten die bestehenden intraketten Disulfidbrucken so unter Spannung gesetzt werden, daß ein Disulfidaustausch ermoglicht wird.
Ein entsprechendes Modell des Disulfidaustausches wurde von Yamamoto und Migita (96) fur das Komplement Protein C9 aufgestellt. Dort werden durch Polymerisierung von C9 intramolekulare Disulfidbrücken so in Position gebracht, daß nach spontaner Reduktion oder nach Einwirkung von Glutathion sich durch Disulfidaustausch intermolekulare Disulfidbrucken bilden, die das C9 Polymer stabilisieren.
Mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten uber die intra- und intermolekulare Disulfidverbruckung der NC1-Domane konnten entsprechende Untersuchungen mit aus Zellkultur isolierten Typ IV Kollagen Monomeren durchgefuhrt werden.

Die interspezies Homologieanalyse brachte zu Tage, daß 95% der humanen Sequenzen identisch sind mit denen von Maus. Ein interspezies Vergleich der bisher bekannten Sequenzen der zentralen Typ IV Tripelhelix zwischen Mensch und Maus zeigt dagegen nur 85% identische Aminosaurepositionen (46). Dies deutet auf eine Tendenz hin, die NC1-Domane wahrend der Evolution in ihrer Struktur und damit in ihrer Funktion zu konservieren, um damit die Ausbildung des Typ IV Netzwerkes

zu gewahrleisten. Die Typ IV Tripelhelix bestimmt durch ihre Lange die Maschengroße in diesem Netzwerk und eine Anderung der Primarstruktur dort wurde nur wenige Konsequenzen fur die makromolekulare Struktur mit sich bringen. Somit unterliegt sie sicherlich einem geringeren Selektionsdruck, als es für die NC1-Domäne der Fall ist.
Einem der NC1-Domane vergleichbaren hohen Selektionsdruck sind nur die Tripelhelizes der interstitiellen Kollagene ausgesetzt. Sie bilden Fibrillen, welche eine strikte Erhaltung der Verteilung der geladenen und der hydrophoben Aminosäuren erfordern. Daher findet man unter ihnen auch eine Indentität von 95% der Aminosäuren.

Ein Modell fur die Ausbildung des Typ IV Netzwerkes durch Aggregation über gleiche Enden der Typ IV Kollagenmoleküle kann schließlich wie folgt formuliert werden:
Nach Synthese der Typ IV Polypeptidketten, Bildung von intraketten Disulfidbrücken, Aggregation der Ketten über die NC1-Bereiche und Ausbildung der Tripelhelix wird Typ IV Kollagen sezerniert. Es findet keine weitere Prozessierung durch Abspaltung von Propeptiden statt. Das Molekül aggregiert mit seinem N-Terminus antiparallel mit dem N-Terminus eines weiteren Kollagenmoleküls. Die Aggregation wird durch Bildung von intermolekularen Disulfidbrucken fixiert, welche z.B. durch Disulfidaustausch von bereits bestehenden intramolekularen Disulfidbrücken in den monomeren Kollagenmolekülen entstehen. Zusätzlich werden auch schon nicht reduzierbare Quervernetzungen ausgebildet. Anschließend oder wahrenddessen aggregieren zwei solcher

antiparalleler Dimere zu einem Tetrameren, deren Assoziation ebenfalls durch Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken durch Disulfidaustausch verfestigt wird. In geringerem Maß werden auch kovalente, Lysin abstammende Quervernetzung zwischen diesen beiden Dimeren gebildet. Außerdem aggregieren zwei Typ IV Kollagenmolekule uber ihre NC1-Domanen, wobei fur die Aggregation derselbe Primarstrukturbereich verantwortlich sein konnte wie fur die Kettenassoziation in der Zelle. Durch Konformationsanderungen bildet sich eine energetisch gunstige, vielleicht kompakte Struktur und durch Disulfidaustausch werden die Domanen kovalent uber Disulfidbrucken verknupft. Schließlich werden vereinzelt nicht reduzierbare Quervernetzungen ausgebildet, deren Natur noch unbekannt ist.

5. Zusammenfassung

(1) 7s-Kollagen wurde in der kurzen und der langen Form aus Plazenta isoliert, in die α1- und α2-Kette aufgetrennt und mittels Bromcyan und Proteasen gespalten. Die dabei entstandenen Spaltpeptide wurden gereinigt und durch ihre Große, Aminosäurezusammensetzung und teilweise durch ihre N-terminale Sequenz charakterisiert.

(2) Die Primarstruktur beider Ketten konnte aufgeklärt werden, was vor allem auch die Lokalisierung von Cysteinen und Lysinen bzw. Hydroxylysinen beinhaltete. Es zeigte sich, daß die Ketten aus homolog verlaufenden Sequenzbereichen aufgebaut sind.

(3) Im N-terminalen Überlappungsbereich des Typ IV Kollagen Moleküls besitzt jede der drei α-Ketten ein biantennares Oligosaccharid vom Mannose reichen Typ.

(4) Mit Hilfe von Interaktionsanalysen konnte eine Position zweier antiparalleler 7s-Tripelhelizes zueinander gefunden werden, bei der nicht nur eine maximale Wechselwirkung hydrophober Aminosäuren gewährleistet ist, sondern auch Cysteine und Lysine bzw. Hydroxylysine miteinander reagieren können, wodurch eine kovalente Verknüpfung ermöglicht wird. Dies erlaubte, für die Aggregation der Typ IV Kollagen N-Termini ein Modell

aufzustellen, worin zunachst die N-Termini zweier Typ IV Kollagen Molekule zu Dimeren aggregieren, diese durch intermolekulare Disulfidbrucken und Lysin abstammende Quervernetzungen fixiert werden und abschließend zwei Dimere zu Tetrameren Typ IV Molekulen assoziieren, welche ebenfalls durch Disulfidbrucken, weniger durch nicht reduzierbare Quervernetzungen verfestigt werden.

(5) Die NC1-Domäne wurde aus Plazenta in hexamerer Form isoliert und in ihre α1-, α2- und dimeren α-Ketten aufgetrennt. Die monomeren α-Ketten wurden mit chemischen und enzymatischen Methoden gespalten und die gereinigten Spaltpeptide nach Große, Aminosaurezusammensetzung und N-terminaler Sequenz charakterisiert. Hierdurch gelang es 76% bzw. 93% ihrer Primarstruktur aufzuklären.

(6) Homologieanalysen ergaben, daß die NC1-α-Ketten sowohl sehr verwandt sind als auch, daß sie aus einer sich wiederholenden Einheit aufgebaut sind. Es konnte eine im Vergleich zur Tripelhelix erhöhte Homologie zu entsprechenden Maussequenzen und eine lokale Verwandtschaft zu den Carboxypropeptiden der fibrillenbildenden Kollagene festgestellt werden.

(7) Die sechs intraketten Disulfidbrücken der zwölf Cysteine konnten lokalisiert werden und bestatigten in

ihrer Anordnung den Aufbau der Ketten aus zwei homologen Einheiten.

(8) Es konnte gezeigt werden, daß die dimeren α-Ketten der NC1-Domane zum großten Teil aus α1-Ketten zusammengesetzt sind, welche durch interketten Disulfidbrücken in einer zu den intraketten Disulfidbrücken analogen Orientierung zusammengehalten werden. Außerdem wurde festgestellt, daß ein weitaus geringerer Teil aus zwei uber Disulfidbrucken verknupften α2-Ketten und zwei α1-Ketten besteht, welche neben Disulfidbrucken auch von Lysin abstammende Quervernetzungen enthalten. Aus einer α1- und einer α2-Kette zusammengesetzte Dimere existieren nicht.

6. Material und Methoden

6.1. Herstellung der Ausgangsmaterialien

Als Ausgangsmaterial fur die Isolierung der verschiedenen Typ IV Kollagen Fragmente diente menschliches Plazentagewebe, welches von den Behringwerken (Marburg) stammte und dort zerkleinert und mit isotonen Salzlosungen extrahiert worden war.

6.1.1 Limitierter Pepsinabbau

1 kg gewaschenes Plazentagewebe wurde dreimal mit 0.5M Ameisensäure gewaschen und anschließend in 3.8 l 0.5M Ameisensaure aufgenommen. Durch Zugabe einer Losung von 500mg Pepsin (2500 U/mg; Fa. Boehringer, Mannheim) in ca. 25ml 0.5M Ameisensaure wurde der Pepsinabbau gestartet und 16h bei 4°C geruhrt. Das ungelöste Gewebe wurde 30 Min. bei 10000U/min abzentrifugiert, in 0.5M Essigsaure aufgenommen, 1.5h geruhrt und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten Uberstande wurden mit festem NaCl auf 4.1%ige NaCl-Losung gebracht und nach 3-stundiger Prazipitation abzentrifugiert. Das ausgefällte Protein wurde in 1.2 l 0.2M NaCl, 0.03M Tris/HCl, ph 7.6 gelost, der pH-Wert mit NaOH nachgestellt

und bei 4°C 16h gegen den gleichen Puffer dialysiert. Hierdurch wurde das Pepsin inaktiviert. Der nach Zentrifugation (17000U/min, 90Min.) bleibende Rückstand wurde verworfen. Aus dem klaren Überstand konnte Typ IV Kollagen durch langsame Zugabe von NaCl bis zu einer Konzentration von 1.8M ausgefällt werden. Das präzipitierte Protein wurde erneut in ca. 800ml 0.2M NaCl, 0.03M Tris/HCl, pH 7.6 aufgenommen, und um das bei der ersten Fällung mitgerissene Typ I Kollagen zu entfernen, einer zweiten Fallung mit 1.7M NaCl unterworfen. Die NaCl-Zugabe erfolgte während 16h durch Zutropfen einer 5M NaCl-Lösung. Das präzipitierte Protein wurde in 0.2M NaCl, 0.03 Tris/HCl, 2M Harnstoff, pH 8.4 aufgenommen und gegen diesen Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde nach Zentrifugation in einer DEAE-Suspension (DEAE-Batch-Verfahren) 3h inkubiert und anschließend filtriert. Die DEAE-Zellulose wurde 3 mal mit ca. 200ml des gleichen Puffers gewaschen. Anschließend wurden die Filtrate vereinigt, gegen 0.1M Essigsäure ca. 3 Tage dialysiert und lyophilisiert.

6.1.1.1. Isolierung von 7s-Kollagen in kurzer Form

Die kurze Form des 7s-Kollagens wurde aus Pepsin-gelösten Typ IV Kollagen Tetrameren durch Behandlung mit Trypsin (Tosylphenylalanylchloromethane behandelt, 230 U/mg, Worthington) hergestellt. Das Material wurde hierzu in 0.5M $CaCl \cdot 2\ H_2O$, 0.05M Tris/HCl, pH8.1 bei 50°C gelöst, kurz

aufgeruhrt und bei 45°C fur 24h inkubiert. Das Enzym/Substrat Verhaltnis war 1:25. Die Reaktion wurde durch Ansauern gestoppt, der Reaktionsansatz entsalzt und lyophilisiert. Das intakte 7sS-Kollagen wurde durch Chromatographie an einer Agarose A5.0 Säule, equilibriert in 0.05M Tris/HCl, 1M $CaCl_2$, pH 7.5 von kleinen Bruchstucken abgetrennt, entsalzt und lyophilisiert.

6.1.1.2. Isolierung von 7s-Kollagen in langer Form

Das 7sL-Kollagen wurde in Anlehnung an Qian und Glanville (75) durch Behandlung mit bakterieller Kollagenase (Typ IV Clostridiopeptidase; Millipore Corp.) hergestellt. Hierzu wurden Typ IV Kollagen Tetramere in 30mM Tris/HCl, 10mM $CaCl_2$, pH 7.6 gelost (1:10) und bei 25°C fur 24h inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde gegen 0.1M Essigsaure dialysiert, lyophilisiert, und anschließend das Lyophilisat in 0.05M Tris/HCl, 1M $CaCl_2$, pH 7.5 gelöst. Hieraus konnte 7sL-Kollagen an einer Agarose A5.0 Säule, equilibriert in 0.05M Tris/HCl, 1M $CaCl_2$, pH 7.5 gereinigt werden.

6.1.2. Zweistufen-Kollagenase-Abbau

1 kg Plazentagewebe wurde mit Wasser, 0.5M Na-Acetat und 0.5M Ameisensaure gewaschen und umaquilibriert in 30mM

Tris/HCl, 10mM $CaCl_2$, pH 7.6. Die erste Stufe des Kollagenase-Abbaus wurde in Anlehnung an Weber et.al. (49) durch Zugabe von 500 Einheiten bakterieller Kollagenase/kg Gewebe (CLSPA, Millipore Corp.) in 3 Portionen gestartet und bei 20°C für 24h inkubiert. Die filtrierten Gewebeteile wurden intensiv mit 0.5M Essigsäure gewaschen, erneut filtriert und die gelösten Proteine dieses Filtrats ausgefallt durch Zugabe von NaCl bis zu einer Konzentration von 10%. Nach Zentrifugation (7000U/min, 1h) wurde der Niederschlag in 0.2M NaCl,30mM Tris/HCl, pH 7.6 aufgeschlämmt und gegen den gleichen Puffer dialysiert.
Das Filtrat der ersten Filtration wurde ebenfalls auf 10% NaCl eingestellt, das Präzipitat in 0.2M NaCl, 30mM Tris/HCl, pH 7.6 aufgeschlämmt und dialysiert und beide Aufschlämmungen vereinigt zentrifugiert (17000U/min, 1.5h). Die Typ IV Kollagen Bestandteile konnten anschließend mit 2.2M NaCl ausgefällt werden. Es folgte nun ein DEAE-Batch-Verfahren, welches in 0.2M NaCl, 30mM Tris/HCl, 2M Harnstoff, pH 8.1 durchgeführt wurde. Das nicht an die Zellulose gebundene Material wurde gegen 30mM Tris/HCl, 10mM $CaCl_2$, pH 7.6 dialysiert und anschließend im zweiten Schritt des Kollagenase-Abbaus wiederholt mit Kollagenase versetzt (0.2U/mg Festsubstanz) und bei 37°C für 16h inkubiert. Dieses Material wurde gegen 0.1M Essigsaure dialysiert, wobei die Kollagenase inaktiviert wurde und am Rotationsverdampfer eingeengt (30°C, Wasserstrahlvakuum).

6.2. Reduktion von Disulfidbrücken und Blockierung von freien Thiol-Gruppen

6.2.1. Reduktion unter denaturierenden Bedingungen

Für die Reduktion unter denaturierenden Bedingungen und die Blockierung wurden zwei Methoden angewandt:

(A) 100mg 7s-Kollagen wurden in 10ml H_2O mit 100mg $NaBH_4$ (Merck, Darmstadt) 1h bei Raumtemperatur inkubiert (pH-Wert erhöht sich dabei von 8 auf 10). Diese Reaktion bewirkt die Reduktion von Lysin abstammenden Quervernetzungen und damit ihre Stabilisierung. Hieran anschließend wurde in Anlehnung an Gollwitzer et.al. (97) die Lösung 8M an Harnstoff und 0.5M an Tris/HCl gemacht und der pH-Wert auf 8.4 eingestellt. Das Gemisch wurde 1h bei 60°C und 1h bei Raumtemperatur mit 0.1ml β-Merkaptoethanol (SIGMA, USA) inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in Abständen von 10 Minuten mit 120 μl, 60 μl und 60 μl Aziridin (SIGMA, USA) behandelt und danach weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit HCl auf pH 5 angesäuert, gegen 0.1M Essigsäure dialysiert und lyophilisiert.

(B) 100mg Protein wurden in 10ml 6M Guanidiniumhydrochlorid/HCl, 0.1M Tris, 1mM EDTA, pH 8.3 (N_2 gesättigte Lösung) mit einem 20-50-fach molaren Überschuß über die Cysteine an DTT (Roth,Karlsruhe) versetzt und bei 37°C für 1h inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe eines 1.1-fachen Uberschusses an Na-Iodacetat (Serva, Heidelberg) gestoppt, welches im Dunkeln mit dem Reaktionsgemisch bei 37°C fur 1h zur Reaktion kam. Zur Erhohung der Ausbeute wurden diese Vorgange wiederholt, anschließend wurde gegen 50mM NH_4HCO_3, 0.1% β-Merkaptoethanol dialysiert und lyophilisiert.

6.2.2. Reduktion unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Fur die Reduktion unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurde die Probe in 0.1M Na-Phosphate-Puffer, pH 8.0 (3:1, w/v) gelost, 0.04M an DTT gemacht und bei 20°C fur 16h inkubiert. Anschließend wurde mit einem vierfachen molaren uberschuß an Aziridin alkyliert, indem die Probe bei 20°C fur 8h inkubiert und der pH-Wert mit verdunnter HCl bei 8 gehalten wurde. Die Reagentien wurden durch Dialyse gegen 0.05M Na-Phosphat-Puffer, pH 7.2 entfernt (45).

6.3. Chromatographische Methoden

6.3.1. Klassische Molekularsiebchromatographie

Die Reinigung von Peptidgemischen wurde an sogenannten Trenneinheiten durchgefuhrt. Diese bestanden in der Regel

aus einer Glassaule, einer Peristaltik-Pumpe (LKB, Perpex) zur Aufrechterhaltung eines konstanten Durchflusses, einem Spektralphotometer (Beckmann DB) und einem Fraktionssammler (LKB ultrorac 2070, ultrorac 2070 II). Der Proteingehalt des Eluats wurde mit einer Durchflußkuvette bei 220 bis 240nm, 265nm oder 280nm gemessen und mit einem Schreiber (Beckmann 10") aufgezeichnet. Die Laufpuffer wurden vor dem Gebrauch entgast.

(1) Biogel Agarose A5.0 (200-400 mesh) (Biorad Lab.)

Säulenabmessungen: 3.5 x 150 cm
5 x 150 cm

Laufpuffer : 1M $CaCl_2$, 50mM Tris/HCl, pH 7.5

Durchfluß : 70ml/h und 85ml/h

(2) Biogel Agarose A1.5 (200-400 mesh) (Biorad Lab.)

Säulenabmessungen: 3.5 x 150 cm
5 x 150 cm

Laufpuffer : 1M $CaCl_2$, 50mM Tris/HCl, pH 7.5

Durchfluß : 65ml/h und 80ml/h

(3) Sephadex G75 superfine (Pharmacia)

Säulenabmessungen: 3.5 x 150 cm

Laufpuffer : 0.05M NH_4OAc, pH 4.8

Durchfluß : 30ml/h

(4) Sephacryl S-300 (Pharmacia)

Saulenabmessungen: 2.5 x 150 cm

Laufpuffer : 0.1M NH_4OOCH, pH 3

Durchfluß : 60ml/h

(5) Biogel P 2 (100-200 mesh) (Biorad Lab.) zum Entsalzen

Säulenabmessungen: der Probenmenge entsprechend

Laufpuffer : 0.1M Essigsäure

Durchfluß : 200-800ml/h

6.3.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

(A) Für die Molekularsieb-HPLC wurde eine HPLC-Pumpe (Modell 2150, LKB), ein Photometer mit variabler Wellenlänge (Modell UV BT 3030, Biotronic oder Knaur UV/VIS Filterphotometer) und zur Aufzeichnung ein Schreiber (Servogor 120 2 Kanal Recorder oder Beckman 10") benutzt. Die Trennungen wurden auf TSK-Säulen mit unterschiedlichen Trennbereichen oder auf Kieselgelsäulen durchgeführt.

(1) TSK 3000, TSK 2000 (LKB, Schweden)

Säulenabmessungen: 600 x 7.5 mm

Laufpuffer : 0.01-0.2M NH_4Acetat, 0.05%-0.15% TFA;

0.05% TFA;

0.2M $(NH_4)_2SO_4$, 0.05% TFA;

6M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3.3 (HCOOH);

6M Guanidiniumhydrochlorid, 0.5M Tris/HCl, pH 8.2;

30% Essigsaure;

10% iso-Propanol, 0.1% TFA;

Durchfluß : 0.05-0.5ml/min

(2) Kieselgelsäule 60 A und 100 A (LiChrospher Si60 bzw. Si100, 10 µm, Bischoff Analysentechnik, Leonberg)

Säulenabmessungen: 500 und 250 x 4.5 mm

Laufpuffer : 90% Ameisensäure

Durchfluß : 0.1-1ml/min

(B) Die Chromatographie an reversed phase HPLC-Saulen wurde mit einem Spectra-Physics HPLC System SP 8000 mit einem Schöffl Photometer Modell 770 mit variabler Wellenlange oder mit einer HPLC-Anlage der Fa. Waters Millipore, bestehend aus einem Gradienten-Controller Modell 680, 2 Pumpen Modell 510 und einem variablen Wellenlängen Photometer, LC Spectrophotometer (Lamda-Max, Modell 481) durchgeführt. Detektiert wurde bei 220 bis 245nm, 265nm oder 280nm. Die Absorption des Eluates wurde mit einem 2 Kanal Schreiber der Fa. LKB, Modell 2210 aufgezeichnet. Die Säulen wurden in einem Wasserbad der Fa. Julabo, Modell R 5 thermostatisiert (25-55°C).

Säulen: Vydac 201 TP104 (C18, 10 µm, 60 A)

Vydac 214 TP54 (C4, 5 µm, 60A)

Bakerbond Wide Pore Butyl (C4, 5 µm)

u-Bondapak C18 (C18, 5 µm)

u-Bondapak Phenyl (Phenyl, 5 µm)

Merck Hibar (LiChrosorb, C18, 5 µm)

Merck Hibar (LiChrosorb, C2, 5 µm)

Säulenabmessungen: 4.6 x 250 mm

9 x 250 mm

Laufpuffer: A: wässrige 0.1%ige TFA-Lösung

B: 70% iso-Propanol bzw. 80% Acetonitril in wässriger, 0.1%iger TFA-Lösung und 70% iso-Propanol in wässriger, 50%iger Ameisensäure

Durchfluß: 1-2ml/min

6.4. Analytische Methoden

6.4.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Diskgel-Elektrophorese)

Es wurden Röhrchen-Gele (80 x 5 mm) mit einer Acrylamidkonzentration von 5% verwendet (99).

Stammlösungen:

A: 20g Acrylamid, 0.52g Bisacrylamid, 1% SDS, 0.1% TEMED 25ml 0.4M Na-Phosphatpuffer, pH 7 Wasser ad 100ml

B: 0.15g Ammoniumpersulfat, 25ml 0.4M Na-Phosphatpuffer, pH 7, Wasser ad 100ml

Mischungsverhaltnis der Losungen A und B : 1:3

Elektrophoresepuffer: 0.1M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 0.4% SDS

Auftragspuffer: 0.1M Na-Phosphatpuffer, pH 7, 4M Harnstoff, 0.1% SDS

50-500 µg Protein wurden in 10-50 µl Auftragspuffer gelost. Als Marker der Ionenfront wurde Bromphenolblau zugegeben. Die Reduktion der Proben erfolgte durch Zugabe von 10% β-Merkaptoethanol oder einer Spatelspitze DTT zum Auftragspuffer und anschließender Inkubation bei 60°C fur 10-30 min.

Stromstärke: 8mA/Gel

Elektrophoresedauer: 5h bei 8mA/Gel

Anfärben und Fixieren erfolgte mit 0.25% Comassie Brilliant Blue R 250 (Serva) in einer wässrigen Losung aus 40% Ethanol, 10% Trichloressigsäure und 8% Eisessig.

Färbedauer: 30 min bei Raumtemperatur

Entfärben in 7% Essigsäure bei 50°C

6.4.2. Slabgel-Elektrophorese

Es wurde das System von Lämmli (99) verwendet. Die Gele bestanden aus eienem 4.5%igem Sammelgel (140x40x1.5mm) und

einem linearen oder Gradienten Trenngel (140x100x1.5mm).

Sammelgel: 4.5% Acrylamid, 0.05% Bisacrylamid, 0.1% SDS, 0.08% TEMED, 0.0035% Ammoniumpersulfat in wassrigem 0.125M Tris/HCl Puffer pH 6.8

Trenngel: 10%, 15%, 20%, 25%ig
10%, 15%, 20% bzw. 25% Acrylamid, 0.2% Bisacrylamid, 0.1% SDS, 0.04-0.01% TEMED, 0.03-0.01% Ammoniumpersulfat in wässrigem 0.4M Tris/HCl Puffer, pH 8.8

Laufpuffer: 25mM Tris/HCl, pH 8.3, 20mM Glycin, 0.1% SDS

Probenpuffer: 10mM Tris/HCl, pH 6.8, 0.5-2% SDS, 10% Glycerin, 0.001% Bromphenolblau, evtl. 5% β-Merkaptoethanol

Probenmenge: 10-100 µg in 5-15 µl Probenpuffer

Laufzeit: abhangig von der Acrylamidkonzentration, 6-16h bei 70-250V

Färben und entfärben wie in 6.4.1. oder mit einer Mischung aus Essigsaure, Ethanol und Wasser im Verhaltnis 1:3.5:5.5

6.4.3. Aminosaureanalysen

50-100 µg Protein wurden bei 110° unter N_2-Schutz 24h in 2ml 25% HCl-Lösung in einem abgeschmolzenen Reagensglas hydrolysiert und anschließend eingedampft. Die trockenen Hydrolysate von BrCN-Peptiden wurden mit 0.5ml 1%iger Piperidin-Losung bei 37°C fur 1h inkubiert und anschließend wieder eingedampft.
Die Zusammensetzung wurde nach der Methode von Moore (100) mit einem Aminosaureanalysator der Fa. Durrum (Modell D 500) oder der Fa. Biotronic (LC 5001) durch Nachsaulenderivatisierung mit Ninhydrin bestimmt. Der LC 5001 war mit einem Datensystem (Trilab 2000) gekoppelt.

6.4.4. Sequenzanalyse

Die N-terminalen Sequenzanalysen wurden in einem spinning-cup-sequencer (liquid-phase) der Fa. Beckman (Modell 890B bzw. 890C) nach der Methode von Edman und Begg (101,102) durchgeführt. Hierzu wurde ein modifiziertes Quadrol-Programm Nr. 072172B der Fa. Beckman Instr. verwendet. Die Konvertierung der Anilinothiazolinonderivate zu den stabilen Phenylthiohydantoinderivaten (PTH) wurde mit wasserfreier methanolischer HCl-Lösung in einem on-line angeschlossenen Autokonverter (P6· Auto-Converter, Sequamat Inc.) durchgefuhrt. Die Identifizierung der PTH-Aminosaure-

derivate erfolgte mit einer HPLC-Anlage, bestehend aus einem Autoinjektor (ASI 210, Anal. Biochemie, München) einer Pumpe (110A, Beckman), einer Saule (Altex ultrosphere ODS PTH oder Merck Lichrosorb RP18 5 µm), einem Photometer (Biotronic UV BT 3030) und einem Integrator (Shimadzu, CR 3a). Die Auftrennung der PTH-Aminosauren (103) erfolgte bei 59-62°C unter isokratischen Bedingungen mit einem Puffer der Zusammensetzung: 0.005-0.01M Na-Acetat, pH 4.5, 31.5% Acetonitril, 0.5% Dichlorethan. Es wurde bei 269nm detektiert.

6.4.5. Kohlenhydratanalysen

Die Hexosamine wurden quantitativ nach einer Methode von Risteli et.al. (45) bestimmt. Hierzu wurden ca. 0.5mg Protein in 0.5ml 3N HCl unter N_2-Schutz in einem abgeschmolzenen Reagensglas bei 105°C für 16h hydrolysiert und anschließend eingedampft. Die Zusammensetzung konnte mit einem Aminosaureanalysator der Fa. Biotronic (LC 5001) durch Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin bestimmt werden.

Hexosen und Hexosamine wurden gemeinsam in Anlehnung an eine Methode von Prehm und Scheid (79) quantitativ bestimmt. Dabei wurden ca. 0.5mg Protein in 1ml 0.5N HCl bei 105°C für 16h in einem abgeschmolzenen Reagensglas hydrolysiert. Nach Zugabe von 10 µg Xylose als internem Standard, wurde das Gemisch bei 0°C alkalisch gemacht und 15 µl 0.2M $NaBH_4$ in

0.1M NaOH zugegeben. Nach Inkubation bei 4°C fur 24h wurden 50 µl Essigsaure zugegeben, eingedampft und 3 mal in 100 µl Methanol aufgenommen und eingedampft. Anschließend wurden 80 µl Pyridin und 80 µl Essigsaureanhydrid zugegeben, das Reagensglas zugeschmolzen und bei 100°C für 25 min inkubiert. Nach Verteilung des Reaktionsgemisches zwischen 200 µl $HCCl_3$ und 400 µl Wasser wurde die $HCCl_3$-Phase abgenommen und abgeblasen. Die Alditolacetate der Hexosen und Hexosamine wurden mit einem Gaschromatographen (Carlo Erba Fractovap 2101) mit einer Quarz Kapillaren (OV1701, 30m x 0.35mm) aufgetrennt und mit einem on-line gekoppelten Massenspektrometer (Varian, CH7A, Datensystem SS200MS) identifiziert. Die Analyse wurde mit 2ml/min He bei 170°C gestartet (2min), anschließend wurde die Temperatur mit 3°C/min bis auf 280°C erhoht. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Korrelation der Peakflachen der Massen 259 und 289 mit denen des Xylose-Alditolacetats.

6.4.6. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Kalibrierung der Sephacryl S-300, TSK 2000, TSK 3000 und Kieselgelsaulen wurden kaufliche Standard-Proteine (Fa.Pharmacia,Schweden) im Molekulargewichtsbereich von 450Da bis 95kDa verwendet. Die graphische Auswertung erfolgte durch halblogarythmisches Auftragen der Molekulargewichte gegen die Elutionsvolumina. Bei der SDS-Gelelektrophorese fanden Standard Proteine der Fa. Serva

und Bio Rad Anwendung.

6.5. Elektronenmikroskopie

Die Rotationskegelbedampfung erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Hall (105). Die Proteinproben wurden in 0.1M Essigsäure gelost (ca. 50 µg/ml) und mit der gleichen Menge an Glycerin verdünnt. Die Lösung wurde aus einer Entfernung von 30cm auf frisch gespaltene Glimmerplättchen aufgesprüht. Anschließend wurden die Proben in die Vakuumkammer einer Zweielektronenstrahl-Bedampfungsanlage (Edwards, Modell 306) gebracht und auf 10^{-5} Torr evakuiert. Die Platinbedampfung erfolgte mit einer Elektronenquelle unter einem Winkel von 9°. Der Kohlefilm wurde unter einem Winkel von 90° aufgebracht. Platindraht (5cm x 0.2mm) wurde um einen 2mm dicken Wolframstab gewickelt und bei 40kV mit einem Emissionsstrom von 50mA vollständig verdampft. Die Proben rotierten auf einem Drehtisch (120U/min) in 15cm Entfernung. Anschließend wurde die Kohle bei 40kV und einem Emissionsstrom von 50-100mA für 10 Sek. verdampft. Die Replikas wurden in 2-3mm große Stücke geschnitten, in destilliertem Wasser abflotiert und mit 400 mesh Kupfernetzen aufgefangen. Die Proben wurden in einem EM Elmiskop (Siemens) bei 100kV mit einer 50 µm Aperatur untersucht. Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden bei einer Vergröserung von 20000 bis 150000 aufgenommen. Zur Berechnung der Vergröserung wurden unter den gleichen elektronenoptischen Bedingungen T4 Phagenschwänze (950nm) und Katalasekristalle (Periodizität

(8.75nm) aufgenommen. Als weitere Kontrolle wurde Typ I Kollagen mit einer Lange von 297nm verwendet.

6.6. Komputeranalysen

Allen Homologieanalysen liegt die Mutation Data Matrix fur Proteine zugrunde, welche von Dayhoff entwickelt wurde (86). Fur Homologiuntersuchungen an Proteinen und Peptiden wurden Programme der "Protein Identification Resource" (PIR) der "National Biomedical Research Foundation" (NBRF) in Georgetown University Medical Center Washington, D.C. 20007 USA verwendet. Für die Untersuchung zweier Peptide auf vorhandene Homologien wurde das PIR-RELATE Programm (87) genutzt, welches vorgegebene Sequenz-Fenster dieser Peptide miteinander vergleicht und das Ergebnis in Bezug setzt zu einem Vergleich zweier Zufallssequenzen der gleichen Aminosaurezusammensetzung. Bei Kenntnis der Homologie zweier Peptide konnte mit dem Programm PIR-ALIGN (84) das beste Alignment dieser Peptide durch Einfugung von Lucken gefunden werden. Die Suche nach homologen Proteinen oder Proteinfragmenten wurde mit dem Programm PIR-SEARCH (87) durchgefuhrt. Hierzu wurde die Proteindatenbank der NBRF (3557 Sequenzen mit 809285 Aminosaureresten, Stand Febr.1986) verwendet.
Die Bearbeitung, eine Homologie Voruntersuchung und die Darstellung von Sequenzen wurde mit den Programm-Paketen PIR-Protein-Sequence-Query-Program der NBRF und der Program Library der University of Wisconsin Genetics Computer Group

(UWGCG) durchgeführt. Dabei kamen im einzelnen folgende Programme zur Anwendung:
FIND, SCAN, MATCH, TYPE, EXTRACT (PIR) und BESTFIT, GAP, COMPARE, DOTPLOT, PRETTY, FIND, SEARCH, PUBLISH (UWGCG).

Berechnungen zur Sekundärstrukturvorhersage von Polypeptidketten wurden mit einem verbesserten Chou-Fasman Programm, entwickelt von Nishikawa (89) und mit PEP2PLOT der UWGCG (114) durchgeführt. Die Werte für α-Helix-, β-Faltblatt- und Turn bildenden und brechenden Aminosauren wurden von Chou und Fasman (88) verwendet.

Die Berechnung der Hydropathie und des hydrophoben Momentes wurden mit Werten von Kyte und Doolittle (77) bzw. Eisenberg et.al. (90) durchgeführt.

6.7. Chemische und enzymatische Spaltungen

6.7.1. Bromcyan-Spaltung

(A) Zur Reduktion der Methioninsulfoxide zu Methionin nach einer Methode von Adelstein und Kuehl (105), wurde die Probe in 0.2M NH_4HCO_3, pH 7 (1:1 bis 1:2, w/v) mit 25% β-Mercaptoethanol bei 60°C fur 16h unter N_2 inkubiert. Das über Biogel P2 entsalzte Material wurde in 70% Ameisensaure gelost, unter N_2 mit BrCN (1:1, w/w; Merck, Darmstadt) versetzt und

bei 35°C für 4h unter N_2 inkubiert. Das BrCN wurde nach Verdunnung mit Wasser auf das vierfache Volumen unter Vakuum uber eine mit NaOH-Granulaten gefullte Saule entfernt.

(B) Die Reduktion der Methioninsulfoxide wurde fur die im Sauren besser loslichen Proben der NC1-Domane nach einer Methode von Houghten und Hao Li (106) in 5%iger Essigsaure gelost, 20%ig an Merkaptoessigsaure (SIGMA, USA) gemacht und bei 37°C für 11-24h oder bei Raumtemperatur für 48h inkubiert. Die Spaltung mit BrCN erfolgte wie unter (A) beschrieben.

(C) Die Spaltung ohne vorherige Reduktion für die Charakterisierung der Disulfidbrücken wurde mit frisch hergestelltem Ausgangsmaterial durchgefuhrt. Die Probe wurde in mit N_2 gesattigter, 70%iger Ameisensaure gelost (1:1, w/v) und bei Raumtemperatur für 48-72h inkubiert. Das BrCN wurde nach Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid (Endkonzentration 4M) und Wasser wie oben beschrieben entfernt.

6.7.2. Spaltung mit o-Iodosobenzoesäure

Die Probe wurde in Anlehnung an Mahoney und Hermodson (107) fast zur Trockene eingeengt, in 80%iger Essigsaure (1:1, w/v) gelost, 4M an Guanidiniumhydrochlorid gemacht und mit einem 1.1-fachen (w/w) Überschuß an o-Iodosobenzoesäure (SIGMA, USA) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur fur 24-40h inkubiert. Anschließend wurde

gegen 10%ige Essigsaure dialysiert und das Dialysat eingeengt.

6.7.3. Spaltung mit Hydroxylamin

100 µg Protein wurden nach einer Methode von Bornstein und Balian (108) in 100 µl 6M Guanidiniumhydrochlorid, 2M Hydroxylamin, 0.2M K_2CO_3, pH 9 bei 45°C gelöst und bei der gleichen Temperatur 4h inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl Ameisensaure wurde die Reaktion gestoppt und anschließend über eine C18 reversed phase HPLC Säule entsalzt.

6.7.4. N-Bromsuccinimid-Spaltung

100 µg Potein wurden in Anlehnung an Witkop (109) in 110 µl 50%iger Essigsaure gelöst, mit 100 µg NBS versetzt, bei Raumtemperatur für 4h inkubiert und anschließend über eine reversed phase HPLC Säule entsalzt.

6.7.5. Trypsin-Spaltung

(A) Die Probe wurde in 0.2M NH_4HCO_3, pH 7.9 oder in 0.05M Tris/HCl, 0.05-0.5M $CaCl_2$, pH 8.1 (1-10:1, w/v) gelöst, mit 1-4% Trypsin (TPCK behandelt, Worthington) versetzt und bei

23-45°C für 16-24h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit Ameisensäure gestoppt.

(B) Die bei pH 8 schwer löslichen Proben der NC1-Domäne wurden in 8M Harnstoff, 0.8M NH_4HCO_3, pH 8 gelöst, auf das vierfache Volumen verdünnt und anschließend mit 4% Trypsin versetzt. Der Fortgang der Reaktion verlief wie unter (A) beschrieben.

6.7.6. Endoproteinase Arg-C-Spaltung

Die Spaltung wurde in 0.2M NH_4HCO_3, pH 7.8 oder in 0.2M Tris/HCl, 3mM Glycin, pH 8 (1:1, w/v) mit 2.5% Enzym (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C für 16h inkubiert und mit Ameisensäure gestoppt.

6.7.7. Staphyloccocus aureus V8 Proteinase-Spaltung (110)

(A) Protein wurde in 0.2M NH_4HCO_3, pH 7.8 (1:1, w/v) gelöst, mit 2-4% Enzym (550U/mg, Miles) versetzt und bei 37°C für 16h inkubiert. Die Reaktion wurde mit Ameisensäure gestoppt.

(B) Die Spaltung mit schwer löslichem Material wurde im Puffer wie unter (A) beschrieben mit zusätzlich 4M Harnstoff

durchgeführt.

(C) Die Spaltung im zweiten pH-Optimum des Enzyms erfolgte durch Lösen des Proteins in 0.1M Essigsäure, Senken des pH-Wertes auf 4.0 durch Zugabe von 0.1M NH_4OAc und Inkubation mit 2-8% Enzym bei 37°C für 16h. Die Reaktion wurde durch Lyophilisation gestoppt.

6.7.8. Pepsin-Spaltung

Die Probe wurde in 2.5%iger Ameisensäure (pH 2.0) gelöst und mit 2-5% Pepsin (Boehringer, Mannheim) bei Raumtemperatur für 16h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Lyophilisation gestoppt.

6.7.9. Carboxypeptidase-Spaltung

Die Bestimmung des C-Terminus erfolgte mit Carboxypeptidase A/B (111)und P (112).

(A) Die Spaltung mit Carboxypeptidase A und B (Boehringer, Mannheim) erfolgte in 0.4M $NaHCO_3$, 8M Harnstoff, pH 8. 0.7mg Protein wurden in 180 µl dieses Puffers gelöst (5:1, w/v), 1-10nM Carboxymethylcystein wurden als interner Standard zugegeben, mit Wasser auf 360 µl verdünnt und Carboxypeptidase A und Carboxypeptidase B in Suspension (1:40 bzw. 1:80,

w/w) zugegeben. Als Kontrolle fur den Ablauf der Reaktion wurde bei 37°C fur 24h inkubiert. Fur die Bestimmung des C-Terminus wurde eine Kinetik aufgestellt, indem zu den Zeiten 0, 15, 30, 60, 120, 240, 480 min je 50 µl des Reaktionsgemisches abgenommen, die Reaktion mit Essigsaure gestoppt und die Aminosäuren jeder Probe mit einem Aminosäureanalysator (Biotronic, Modell LC 5001) durch Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin identifiziert wurden. Quantifiziert wurde durch Korrelation der Peakflächen der Aminosäuren mit der Peakflache des am Anfang zugegebenen Carboxymethylcysteins.

(B) Für die Reaktion mit Carboxypeptidase P (Boehringer, Mannheim) wurde 1mg Protein in 10 µl Essigsaure gelost, anschließend mit Wasser auf 0.5ml verdünnt und 1-10nM Carboxymethylcyctein als interner Standard zugegeben. Die Kontrolle der Reaktion, der Ablauf der Kinetik und die Quantifizierung verlief analog zu (A). Die Reaktion wurde zusätzlich gestoppt durch Lyophilisation.

7. Literatur

(1) Mayne, R., von der Mark, K.
in Collagens of Cartillage (ed. Hall, B.H.): "Crtillage, Vol.1", New York:Academic Press, 181-214

(2) Henkel, W., Glanville, R.W.,
Eur. J. Biochem 122 (1982) 205-213

(3) Martinez Hernandez, A., Gay, S., Miller, E.J.,
J. Cell. Biol. 92 (1982) 343-349

(4) Mayne, R.
in The Role of Extracellular Matrix in Development (ed. Trelstad, R.L.) 33-42, Alan, R. Liss Inc., 150 Fifth Avenue, New York, N.Y.10011

(5) Furthmayr, H., Wiedemann, H., Timpl, R., Odermatt, E., Engel,
J., Biochem. J. 211 (1983) 303-311

(6) Von der Mark, H., Aumailley, M., Wick, G., Fleischmajer, R., Timpl, R.,
Eur. J. Biochem. 142 (1984) 493-502

(7) Bentz, H., Morris, N.P., Murray, L.W., Sakai, L.Y., Hollister, D.W., Burgeson, P.E.,
Proc Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 3168-3172

(8) Morris, N.P., Douglas, R.K., Glanville, R.W., Bentz, H., Burgeson, R.E.,
J. Biol. Chem. 261 (1986) 5638-5644

(9) von der Mark, K., van Menxel, M., Wiedemann, H.,
Eur. J. Bioch. 124 (1982) 57-62

(10) Schmid, T.M., Conrad, H.E.,
J. Biol. Chem. 260 (1982) 12444-12450

(11) Burgeson, R.E., Hebda, P.A., Morris, N.R., Hollister, D.W.,
J. Biol. Chem. 257 (1982) 7852-7856

(12) Ramachandrachan, G.N., Ramakkrishnan,C.,
in Biochemistry of Collagen (ed. Ramachandran, G.N., Reddi, A.H.) Plenum Press New York (1976) 45

(13) Segal, D.M.,
J.Mol.Biol.43 (1969) 497

(14) Fietzek, P., Kühn, K.,
in Int.Rev.Connect.Tissue Res.7 (1976) 1-60

(15) Hofmann, H., Fietzek, P., Kuhn,K.,
J.Mol.Biol.125 (1978) 137

(16) Kuhn, K.,
Collagen Rel. Res. 2 (1982) 1-20

(17) Fessler, J.H., Fessler, L.I.,
Annu. Rev. Biochem. 47 (1978) 129-162

(18) Trelstad, R.L., Hayashi, K.,
Dev. Biol. 71 (1979) 228-242

(19) Hörlein, D., Fietzek, P.P., Wachter, E., Lapiere, C.M.,
Kuhn, K.,
Eur. J. Biochem. 99 (1979) 31-38

(20) Fessler, L.I., Morris, N.P., Fessler, J.H.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 4905

(21) Prockop, D.J., Berg, R.A., Kivirikko, K.J., Uitto, J.,
in Biochemistry of Collagen (ed. Ramachandran, G.N.,
Reddi, A.H.) (1976), N.Y. Plenum, 163-273

(22) Prockop, D.J., Kivirikko, K.J., Tuderman, L., Guzman,
N.A.,
N. Engl. J. Med. 301 (1979) 13-23, 77-85

(23) Kivirikko, K.J., Myllyla, R.,
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 8 (1979) 23-72

(24) Bruckner, P., Bachinger, P., Timpl, R., Engel, J.,
Eur. J. Biochem. 90 (1978) 595-603

(25) Siegel, R.C., Martin, G.R.,
J. Biol. Chem. 245 (1970) 1653-1658

(26) Siegel, R.C.,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 (1974) 4826-4930

(27) Bornstein, P., Piez, K.A.,
Biochemistry 5 (1966) 3460-3473

(28) Robins, S.P., Bailey, A.J.,
Biochem. J. 149 (1975) 381-385

(29) Fujimoto, D., Moriguchi, T., Ishida, T., Hagashi, H.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84 (1978) 52-57

(30) Tanzer, H.L., Housley, T., Berube, L., Fairweather, R.,
Franzblau, C., Gallop, P.M.,
J. Biolog. Chem. 248 (1973) 393

(31) Robins, S.R., Shimokomaki, M., Bailey, A.J.,
Biochem. J. 131 (1973) 771-780

(32) Vracko, R.
in New Trends in Basementmembrane Research (ed. Kühn, K.) (1982) Raven Press, New York 1-8

(33) Farquhar, M.G.
in Cell Biology of the Extracellular Matrix (ed. Hay, E.D.) (1981) 335-378, Plenum Press, New York

(34) Kefalides, N.A.,
in Biology and Chemistry of Basementmembranes (ed. Kefalides, N.A.) Academic Press, New York

(35) Martinez Hernandez, A., Amenta, P.S.,
Lab. Invest. 48 (1983) 656-677

(36) Bernfield, M., Banerjee, S.D., Koda, J.E., Rapraegr, A.E.,
in Basementmembranes and Cell Movement (1984) 179-192, CIBA Foundation Symposium 108, Pitman, London

(37) Farquhar, M.G.,
in Biology and Chemistry of Basementmembranes (ed. Kefalides, N.A.) (1978) 43-80,Academic Press, New York

(38) Kefalides, N.A., Winzler, R.J.,
Biochem 5 (1966) 702-713

(39) von der Mark, K.,
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 9 (1981) 265-324

(40) Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R. Ristelli, J., Dieringer, H., Voss, T., Glanville, R.G.,
FEBS Lett. 125 (1) (1981) 123-128

(41) Timpl, R., Wiedemann, H., Van Delden, V., Furthmayr, H., Kühn, K.,
Eur. J. Biochem. 120 (1981) 203-211

(42) Kefalides, N.A.,
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 6 (1973) 63-104

(43) Oberbäumer, I., Wiedemann, H., Timpl, R. Kühn, K.,
EMBO J. 1 (1982) 805-810

(44) Trueb,B., Gröbli, B., Spiess, M., Odermatt, B.F., Winterhalter, K.H.,
J. Biol. Chem. 257 (1982) 5239-5245

(45) Ristelli, J., Bächinger, H.P., Engel, J., Furthmayr, H., Timpl, R.,
Eur. J. Biochem. 108 (1980) 239-250

(46) Babel, W., Glanville, R.W.,
Eur. J. Biochem. 243 (1984) 545-556

(47) Schuppan, D., Timpl, R., Glanville, R.W.,
FEBS Lett. 115 (1980) 297-300

(48) Dixit, S.N.,
Eur. J. Biochem. 106 (1980) 563-570

(49) Sage, H., Woodbury, R.G., Bornstein, P.,
J. Biol. Chem. 254 (1979) 9893-9900

(50) Timpl, R., Martin, G.R., Bruckner, P.,
Frontiers of Matrix Biology 7 (1979) 130-141

(51) Weber, S., Engel, J., Wiedemann, H., Glanville, R.W., Timpl, R.,
Eur. J. Biochem. 139 (1984) 401-410

(52) Timpl, R., Rhode, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M., Martin, G.R.,
J. Biol. Chem. 254 (1979) 9933-9937

(53) Foidart, J.M., Bere, E.W., Yaar, M., Rennard, S.I., Gullino, M.,
Lab. Invest. 42 (1980) 336-342

(54) Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B., Chung, A.E.,
J.Biol. Chem. 256 (1981) 5209-5214

(55) Charonis, A.S., Tsilibary, E.C., Yurchenco, P.D., Furthmayr, H., J.
Cell. Biol. 100 (1985) 1848-1853

(56) Timpl, R., Martin, G.R.,
in Immunochemistry of the Extracellular Matrix (ed. Furthmayr, H.) Vol.II, 119-150, CRC Press, Boca Raton, FL

(57) Timpl, R., Rohde, H., Ristelli, L., Ott, U., Robey, R.G., Martin, G.R.,
Methods Enzymol. 82 (1982) 831-835

(58) Timpl, R., Engel, J., Martin, G.R.,
Trends Biochem. Sci. 8 (1983) 207-209

(59) Timpl, R., Dziadek, M.,
Int. Rev. Exp. Pathol. (1986) in the press

(60) Hörmann, H.,
Klin. Wochenschr. 60 (1982) 1265-1277

(61) Yamada, K.M.,
Ann. Rev. Biochem. 52 (1983) 761-799

(62) Mc Donagh, J.,
Plasma Fibronectin-Structure and Function (ed. Mc Donagh, J.) (1985) Marcel Dekker, Inc. NY and Basel

(63) Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B., Chung, A.E.,
J. Biol. Chem. 256 (1981) 5209-5214

(64) Timpl, R., Dziadek, M., Fujiwara, S., Nowack, H., Wick, G.,
Eur. J. Biochem. 137 (1983) 455-465

(65) Farquhar, M.G., (1982)
in New Trends in Basement Mambrane Research (ed. Kühn, K., Schöne, H., Timpl, R.) Raven Press N.Y.

(66) Fujiwara, S., Wiedemann, H., Timpl, R., Lustig, A., Engel, J.,
Eur. J. Biochem. 143 (1984) 145-157

(67) Yurchenco, P.D., Tsilibary, E.D., Charonis, A.S., Furthmayr, H., J.
Biol. Chem. 260 (1985) 7636-?????

(68) Dziadek, M., Paulson, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Weber, S., Engel, J.,
in Basement Membranes (ed. Shibata, S.) (1985), Elsevier Science Publishers B.V.

(69) Yurchenco, P.D., Tsilibary, E.C., Charonis, A.S., Furthmayr, H., J.
Histochem. Cytochem. 34 (1986) 93-102

(70) Lesot, H., Kühl, U., von der Mark, K.,
EMBO J. 2 (1983) 861-865

(71) Kurkinen, M., Taylor, A., Garrels, J.I., Hogan, B.L.M.,
J. Biol. Chem. 259 (1984) 5915-5922

(72) Rapraeger, A.C., Bernfield, M.,
J. Biol. Chem. 258 (1983) 3632-3636

(73) Wieslander, J., Bygren, P., Heinegard, D.,
Proc. Acad. Natl. Sci. USA 81 (1984) 1544-1548

(74) Timpl, R., Ristelli, J., Bächinger, H.P.,
FEBS Lett. 101 (1979) 265-268

(75) Qian, R., Glanville, R.W.,
Biochem. J. 222 (1984) 447-452

(76) Hofmann, H., Fietzek, P.P., Kühn, K.,
J. Mol. Biol. 125 (1978) 137-165

(77) Kyte, J., Doolittle, R.F.,
J. Mol. Biol. 157 (1982) 105-132

(78) Levine, M.J., Spiro, R.G., J. Biol. Chem. 254 (1979) 8121-8124

(79) Prehm, P., Scheid, A.,
J. Chromato. 166 (1978) 461-467

(80) Brinker, J.M., Lorraine, J.G., Loidl, H.R., Wang, S., Rosenbloom, J., Kefalides, N.A., Myers, J.C.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 3649-3653

(81) Pihlajaniemi, T., Tryggvason, K., Myers, J.C., Kurkinen, M., Lebo, R., Cheung, M., Prockop, D.J., Boyd, C.D.,
J. Biol. Chem. 260 (1985) 7681-7687

(82) Schwarz, U., Dissertation 1986

(83) Oberbäumer, I., Laurent, M., Schwarz, U., Sakurai, Y., Yamada, Y., Vogeli, G., Voss, T., Siebold, B., Glanville, R.G., Kühn, K.,
Eur. J. Biochem. 147 (1985) 217-224

(84) Barker, W.C., Dayhoff, M.O.,
in Atlas of Protein Sequence and Structure 1972 (ed. Dayhoff, M.O.) Vol.5, 101-110. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 1972

(85) Protein Sequence Database (Dayhoff, M.O., Hunt, L.T., Barker, W.C., Orcutt, B.C., Yeh, L.S., Chen, H.R., George, D.G., Blomquist, M.C., Fredrickson, J.A., Johnson, G.C.).
National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 1981

(86) Yamada, Y., Kühn, K., de Crombrugghe, B.,
Nuc. Acid Res. 11 (1983) 2733-2744

(87) Dayhoff, M.O.,
in Atlas of Protein Sequence and Structure (ed. Dayhoff, M.O.), Vol.5, Suppl.3, 1-8. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 1979

(88) Chou, P.Y., Fasman, G.D.,
Adv. Enzymol. 47 (1978) 45-148

(89) Nishikawa, K.,
Biochem. Biophys. Acta 748 (1983) 285-299

(90) Eisenberg, D., Weiss, R.M., Terwilliger, T.C.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 140-144

(91) Hofmann, H., Voss, T., Kühn, K., Engel, J.,
J. Mol. Biol. 172 (1984) 325-343

(92) Duncan, K.G., Fessler, L.I., Bächinger, H.P., Fessler, J.H.,
J. Biol. Chem. 258 (1983) 5869-5877

(93) Bachinger H.P., Fessler, L.I., Fessler, J.H.,
J. Biol. Chem. 257 (1982) 9796-9803

(94) Timpl, R., Oberbaumer, I., von der Mark, H., Bode, W., Wick, G., Weber, S., Engel, J.,
in Annals of the New York Academy of Science Vol.460 (ed. Fleischmajr, P., Olsen, B.R., Kühn, K.) (1985) 58-72

(95) Schwarz, U., Schuppan, D., Oberbäumer, I., Glanville, R.G., Deutzmann, R., Timpl, R., Kühn, K.,
Eur. J. Biochem. 157 (1986) 49-56

(96) Yamamoto, K., Migita, S.,
J. Biol. Chem. 258 (1983) 7887-7889

(97) Gollwitzer, R., Becker, U., Timpl, R.,
FEBS Lett. 47 (1974) 177-180

(98) Weber, K. Osborne, M.,
J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406-4412

(99) Laemmli, U.K.,
Nature 227 (1970) 680-685

(100)Moore, S., Spackmann, D.H., Stein, W.H.,
Anal. Chem. 30 (1958) 1185-1190

(101)Edman, P., Begg, G.,
Eur. J. Biochem. 1 (1967) 80

(102)Edman, P., Henschen, A.,
in Protein Sequence Determination (ed. Needleman, S.B.) Vol.* (1975) 232-279

(103)Lottspeich, F.,
in High Performance Chromatography in Protein and Peptide Chemistry (ed. Lottspeich, F., Henschen, A., Hupe, K.P.) (1981) Walter de Gruyter Co. Berlin-New York

(104)Hall, C.E., Dott, P.,
J. Amer. Chem. Soc. 80 (1958) 1261-1274

(105)Adelstein, R.S., Kühl, W.M.,
Biochem. 9 (1970) 1355-1364

(106)Houghten, R.A., Hao Li, C.,
Methods Enzymol. 91 (1983) 549-558

(107)Mahoney, W.C., Hermodson, M.A.,
Biochem. 18 (1979) 3810-3814

(108)Bornstein, P., Balian, G.,
Metods Enzymol. 47 (1977) 132-145

(109)Witkop, B.,
Advan. Protein Chem. 16 (1961) 221

(110)Drapeau, G.R., Boily, Y., Houmard, J.,
J. Biol. Chem. 247 (1972) 6720-6726

(111)Ambler, R.P.,
Mehtods Enzymol. 25 (1967) 262-272

(112)Yokoyama, S., Oobayashi, A., Tanabe, O., Ishishima, E.,
App. Microbiol. 28 (1974) 742

(113)Glanville, R.W., Rauter, A., Fietzekk, P.,
Eur. J. Biochem. 95 (1979) 383-389

(114)Gribskov, M., Burgess, R., Devereux, J.,
Nucl. Acids Res. 14 (1986) 327-334

(115)Schuppan, D., Glanville, R.G., Timpl, R.,
Eur. J. Biochem. 123 (1982) 505-512

Lebenslauf

Bernhard Siebold
geboren am 4.3.1955 in Freiburg
Eltern: Walter Siebold, Bankkaufmann
Hildegard Siebold, geb. Oser

1962-1966	Volksschule Freiburg
1966-1974	Kepler-Gymnasium Freiburg
Juni 1974	Abitur
Aug. 1974- Okt.1975	Wehrdienst
1975-1982	Chemiestudium an der TH Karlsruhe
Feb. 1982	Hauptdiplomprüfung in den Fächern: Organische Chemie, Anorganische Chemie, Physikalische Chemie und Chemische Technik
Marz 1982- Nov.1982	Diplomarbeit am Instut für organische Chemie der TH Karlsruhe, Lehrstuhl Prof. Dr. J. Retey
seit April 1983	Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abteilung Bindegewebsforschung, Leiter Prof. Dr. K. Kühn